



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

“ANALISIS DE LA EXPRESION DE MOLECULAS  
REGULADORAS DEL CICLO CELULAR EN CELULAS  
PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS PROCEDENTES  
DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL Y SANGRE  
PERIFERICA MOVILIZADA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. JOSE ANTONIO ALVARADO MORENO

DIRECTOR DE TEIS  
DR. HECTOR MAYANI VIVEROS



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.



PDCB/grad/005 /Jur/2007

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN**  
**ESCOLAR, UNAM**  
Presente.


Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEP el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 213a del 16 de enero de 2008, designó el siguiente jurado para examen grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **JOSE ANTONIO ALVARADO MORENO**, con número de cuenta **9160291-6**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS PROCEDENTES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL Y SANGRE PERIFÉRICA MOVILIZADA"**, dirigida por el Dr. Héctor Mayani Viveros.

Presidente: Dra. Susana Kofman Epstein  
Vocal: Dr. Alejandro García Carranca  
Vocal: Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez  
Vocal: Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso  
Secretario: Dr. Héctor Mayani Viveros

Atentamente

*"Por mi raza hablará el espíritu"*

Cd. Universitaria, a 16 de enero de 2009.

  
**DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL**  
**RESPONSABLE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

  
**DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM  
Tutor (a) Dr. Héctor Mayani Viveros  
Coordinación de PDCB

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO) del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN Siglo XXI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), bajo la dirección del Dr. Héctor Mayani Viveros.

Durante la realización de este estudio se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de la Coordinación de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

*A mi esposa*

*Ma. Antonieta Chávez González*

*Por su amor, apoyo, cariño y comprensión.*

*A mis hijos*

*Ma. Fernanda*

*y*

*José Enrique.*

*Esencia y chispa de mi vida.*

*A mis padres*

*Ma. del Carmen Moreno*

*y*

*Aarón Alvarado.*

*A mis hermanos*

*Enrique †*

*y*

*Arturo.*

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP), UNAM y a la Coordinación de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Dr. Héctor Mayani Viveros.

Por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo, conocer el proceso hematopoyético y su gran apoyo para involucrarme en el mundo de la ciencia.

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Fabio Salamanca Gómez.

Dr. Pedro Ostoa Saloma.

Por su atención, comentarios y sugerencias siempre presentes durante el desarrollo del proyecto.

Al jurado:

Dra. Susana Kofman Epstein.

Dr. Alejandro García Carranca.

Dr. Jaime Ivan Velasco Velásquez.

Dra. María de Lourdes Rodríguez Fragoso.

Por la revisión de este trabajo, sus acertadas observaciones y por sus invaluable consejos.

A Guadalupe Martínez Jaramillo.

Por su atinada presencia y confianza en un momento clave de mi vida.

A Ignacio Valencia

Por su valiosa asistencia técnica.

A los integrantes del grupo de hematopoyesis.

## INDICE

|   | Página    |
|---|-----------|
| <b>Resumen</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>I. Introducción</b>  | <b>4</b>  |
| <b>II. Marco teórico</b>  | <b>5</b>  |
| <b>II.1.</b> El origen de la hematopoyesis.....   | <b>5</b>  |
| <b>II.2.</b> La proteína CD34.....  | <b>6</b>  |
| <b>II.3.</b> Organización del sistema hematopoyético.....   | <b>6</b>  |
| <b>II.4.</b> Microambiente hematopoyético.....  | <b>9</b>  |
| <b>II.5.</b> Citocinas y hematopoyesis.....   | <b>10</b> |
| <b>II.5.1.</b> Factor de células troncales (SCF).....   | <b>12</b> |
| <b>II.5.2.</b> Ligando de la tirosina fetal 3 (Flt-3L).....   | <b>13</b> |
| <b>II.5.3.</b> Trombopoyetina (TPO).....  | <b>13</b> |
| <b>II.5.4.</b> Interleucina 6 (IL-6).....   | <b>14</b> |
| <b>II.5.5.</b> Interleucina 3 (IL-3).....   | <b>14</b> |
| <b>II.5.6.</b> Factor estimulante de colonias de<br>granulocitos macrófagos (GM-CSF).....                                     | <b>15</b> |
| <b>II.5.7.</b> Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).....  | <b>16</b> |
| <b>II.5.8.</b> Eritropoyetina (EPO).....  | <b>16</b> |
| <b>II.5.9.</b> Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....  | <b>16</b> |
| <b>II.5.10.</b> Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ ).....  | <b>17</b> |
| <b>II.6.</b> Fuentes alternas de células troncales hematopoyéticas<br>(CTH) y células progenitoras hematopoyéticas (CPH)..... | <b>18</b> |
| <b>II.6.1</b> Sangre de cordón umbilical (SCU) y<br>sangre periférica movilizada(SPM).....                                    | <b>18</b> |
| <b>II.7.</b> Movilización de células troncales hematopoyéticas.....   | <b>21</b> |
| <b>II.8.</b> Papel de las moléculas de adhesión en la movilización.....   | <b>21</b> |
| <b>II.9.</b> El ciclo celular.....  | <b>23</b> |
| <b>II.10.</b> Reguladores del ciclo celular.....  | <b>24</b> |
| <b>II.10.1.</b> Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs).....  | <b>24</b> |
| <b>II.10.2</b> Ciclinas.....  | <b>26</b> |
| <b>II.10.3.</b> Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI).....   | <b>28</b> |

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| II.10.4. El factor de elongación de la transcripción 2F.....  | 29            |
| II.10.5. La proteína del retinoblastoma (Rb).....   | 31            |
| II.10.6. CMyc.....  | 31            |
| II.10.7. Punto de restricción.....  | 32            |
| II.11. Fases del ciclo celular.....   | 33            |
| II.11.1. Transición GO/G1.....  | 33            |
| II.11.2. Fase G1.....   | 34            |
| II.11.3. Fase S.....  | 35            |
| II.11.4. Transición G2/M.....   | 35            |
| II.11.5. Fase M.....  | 37            |
| II.12. El ciclo celular en células troncales hematopoyéticas (CTH)<br>y células progenitoras hematopoyéticas (CPH)..... | 38            |
| <b>III. Planteamiento del problema</b> .....  | 43            |
| <b>IV. Objetivo general</b> .....   | 44            |
| <b>IV.1. Objetivos particulares</b> .....   | 44            |
| <b>V. Materiales y métodos</b> .....  | 45            |
| V.1. Material biológico .....   | 45            |
| V.2. Obtención de la población de células mononucleares (CMN).....  | 45            |
| V.3. Separación de la subpoblación enriquecida<br>en células troncales hematopoyéticas (CTH).....                       | 46            |
| V.4. Evaluación de los diferentes parámetros.....   | 47            |
| V.5. Cultivos celulares.....  | 47            |
| V.6. Cultivos semisólidos .....   | 48            |
| V.7. Cuantificación de células CD34 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> por inmunocitoquímica.....                            | 48            |
| V.8. Análisis inmunofenotípico de células CD34 <sup>+</sup> por<br>citometría de flujo.....                             | 49            |
| V.9. Determinación de las fases del ciclo celular.....  | 50            |
| V.10. Detección de la expresión de las proteínas p16, p21, p27,<br>Ciclina D y CDK4.....                                | 50            |
| V.11. Análisis morfológico.....   | 51            |
| V.12. Análisis estadístico.....   | 51            |
| <b>VI. Resultados y Discusión</b> .....   | 52            |



|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>VI.1.</b> Caracterización de las poblaciones de estudio.....   | <b>52</b>     |
| <b>VI.1.1.</b> Discusión.....   | <b>62</b>     |
| <b>VI.2.</b> Ciclo celular.....   | <b>67</b>     |
| <b>VI.2.1.</b> Fases del ciclo celular a día cero .....   | <b>67</b>     |
| <b>VI.2.2.</b> Expresión de reguladores de ciclo celular a día cero.....                                  | <b>71</b>     |
| <b>VI.2.3.</b> Expresión de los reguladores del ciclo celular<br>durante el cultivo (Día 7, 14 y 21)..... | <b>76</b>     |
| <b>VI.2.4.</b> Tiempo de doblaje y transito del cultivo celular<br>a siete días de cultivo.....           | <b>80</b>     |
| <b>VI.2.5.</b> Expresión de reguladores del ciclo celular<br>a tiempos cortos .....                       | <b>88</b>     |
| <b>VI.2.6.</b> Discusión.....   | <b>106</b>    |
| <b>VII. Conclusiones</b> .....  | <b>126</b>    |
| <b>VIII. Perspectivas</b> .....   | <b>127</b>    |
| <b>IX. Referencias</b> .....  | <b>129</b>    |
| <b>X. Publicaciones</b> .....   | <b>146</b>    |

## Resumen

Se ha demostrado que la Sangre de Cordón Umbilical (SCU), así como la Sangre Periférica Movilizada, contienen Células Troncales Hematopoyéticas (CTH) y Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH), alternas a la Médula Osea (MO). Se sabe que las células de la SCU, un estado ontogenético del desarrollo más inmaduro, con relación a la SPM de individuos adultos, tiene un mayor potencial proliferativo. En el presente trabajo se decidió analizar un evento estrechamente relacionado con este parámetro: la progresión del ciclo celular. Si bien existen diversos trabajos en la literatura relacionados con este proceso, la gran mayoría se han generado en líneas celulares leucémicas, y no reflejan las condiciones ideales para entender estos procesos y conocer más acerca de la biología de la SCU, que actualmente tiene un valor muy importante en el aspecto clínico.

Inicialmente evaluamos la progresión del ciclo celular y algunas de las moléculas clave, involucradas en dicho evento, en la subpoblación enriquecida en células  $CD34^{+}Lin^{-}$  tanto de la SCU como de la SPM. Encontramos mediante citometría de flujo, que las células de la SCU expresan un mayor número de moléculas CD34 en su membrana celular. Confirmamos lo ya reportado por nuestro grupo de trabajo y otros, en relación a que el potencial proliferativo es mayor en las células de la SCU en los primeros 7 días de cultivo con un incremento de 45 veces con respecto al día cero y de 18 veces en las de la SPM. Esto también en correlación directa con un mayor número de células formadoras de colonias (CFC) en SCU.

Se observó en el momento de colecta y siembra, definido como día cero de cultivo (DO) mediante tinción con yoduro de propidio (YP), que las células  $CD34^{+}Lin^{-}$  de SCU y SPM, se encuentran en altos porcentajes en las fases G0/G1 del ciclo celular y porcentajes muy bajos en las fases S y G2/M. De igual forma detectamos que en la SCU así como en la SPM, más del 90% de la población expresa el inhibidor de cinasas dependiente de ciclina (CDKI) p16, p21 y la Ciclina

D3. A diferencia de lo visto para p27 y la Cinasa Dependiente de Ciclina tipo 4 (CDK4), en donde los porcentajes no superan el 10% de expresión.

Demostramos que la presencia de una combinación de citocinas por 7, 14 y 21 días de cultivo induce el tránsito en el ciclo celular, y una expresión diferencial de los reguladores del ciclo celular. Evaluamos el patrón de expresión de las moléculas y la progresión del ciclo celular, así como el tiempo de doblaje durante los primeros 7 días de cultivo y se observó que el primer tiempo de doblaje en presencia de citocinas es de aproximadamente 33 h para la SCU y de 45 h para la SPM; de igual manera demostramos que en los primeros 7 días de cultivo, existen aproximadamente entre 7 y 9 ciclos detectados en la SCU a diferencia de entre 5 y 7 ciclos en SPM.

En SCU la expresión de la Ciclina D3 y p16 es superior durante las primeras 96 h de obtención. El contenido de p21 es mayor en SCU las primeras 24 h y con expresión cíclica hasta el D7 y en SPM es constante hasta 72 h. Mientras que en el caso de p27, en la SCU en términos de la Intensidad de Fluorescencia Media (IFM), se presentan altos picos secuenciales durante los 7 días del cultivo, los cuales correlacionan con los puntos de quiescencia observados en la progresión del ciclo celular; mientras que en la SPM se observó una expresión constante pero muy por debajo de la mostrada para SCU. Sin embargo en cuanto al porcentaje de expresión, ésta es apenas detectable en ambas. Finalmente, en lo que respecta a CDK4, ésta se mantiene igual en los dos modelos de estudio con niveles de expresión apenas detectables.

Los resultados generados durante el presente estudio confirman que las células de la SCU poseen un alto potencial de proliferación comparado con el de la SPM, y sugieren que tal diferencia biológica es debida, al menos en parte, a diferencias en el estado del ciclo celular, como resultado de la expresión diferencial de algunas de las moléculas que lo regulan.

## **Abstract**

It has been demonstrated that both Umbilical Cord Blood (UCB) and adult Mobilized Peripheral Blood (aMPB) contain Hematopoietic Stem and Progenitor Cells (HSC and HPC, respectively). Previous studies by different groups, including our own, have also shown that UCB-derived HSC and HPC possess significantly higher proliferation and expansion potentials, both *in vivo* and *in vitro*. The actual reasons for such functional differences have not been fully elucidated.

In trying to contribute to our knowledge on the biology of hematopoietic primitive cells, and to understand the functional differences between neonatal and adult HSC and HPC, in the present study, we have assessed the cell cycle status and dynamics of UCB and aMPB primitive cells (CD34<sup>+</sup> Lineage<sup>-</sup> negative) *in vitro*, and analyzed the expression of different cell cycle regulators, including cyclin D3, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), p16, p21, and p27.

At culture onset, the vast majority of the cells were in the G0/G1 phase of the cell cycle. In the absence of cytokines, most cells remained in such a phase and no clear cell cycles were detected throughout the culture period, which correlated with the absence of population doublings. In the presence of cytokines, 4-6 cell cycles and 3-4 population doublings were observed within the first four days of culture. Interestingly, the first population doubling took 30–40 h, whereas the following doublings were significantly shorter (15–20 h).

As expected, UCB cells showed significantly higher proliferation potentials than aMPB cells, particularly during the first 7 days of culture. During this period of time, higher numbers of cell cycles were observed in UCB cells (7–9 cycles), as compared to aMPB cells (5–6 cycles). Higher levels of cyclin D3, CDK4 and p27 were also detected in UCB cells.

Our results confirm that UCB cells possess an intrinsically higher proliferation potential, as compared to aMPB cells, and suggest that such a biological difference is due, at least in part, to differences in cell cycle status; this, in turn, seems to result from the differential expression of cell cycle regulatory molecules.

## I. Introducción

La hematopoyesis es un proceso finamente regulado, mediante el cual se generan todas las células de la sangre a partir de un reducido número de células troncales hematopoyéticas (CTH) y células progenitoras hematopoyéticas (CPH). La hematopoyesis se lleva cabo en diferentes órganos a lo largo del desarrollo prenatal, iniciando en el saco vitelino, seguido por el hígado fetal, bazo fetal y médula ósea (MO). Este último es el órgano en el que se desarrolla más del 95% de la actividad hematopoyética en la etapa postnatal (Mayani et al., 1992).

Tradicionalmente, la MO se considera la fuente principal de células troncales y progenitoras hematopoyéticas, sin embargo, recientemente supimos que la sangre periférica movilizada (SPM) y la sangre de cordón umbilical (SCU) son dos fuentes ricas en CTH y CPH, las cuales inducen una recuperación hematológica semejante a las que genera la MO. Dichas células poseen además todas las características que las células troncales de la MO: se autorrenuevan, tienen potencial multilinaje, son capaces de repoblar ratones inmunodeficientes y se encuentran en estado de quiescencia.

Esta última característica previene la prematura reducción numérica de dichas células *in vivo*, pero ha sido considerada uno de los obstáculos en el contexto de la expansión *in vitro*, procedimiento necesario para el trasplante de CTH y la terapia génica. En los últimos años, diversos grupos de trabajo (incluido el nuestro), se han enfocado en encontrar las condiciones de cultivo *in vitro* (centrándose básicamente en el uso de diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas), que permitan expandir y mantener la población de las CTH. Los resultados encontrados demuestran que las CTH y las CPH de SCU, SPM y MO aunque presenten los mismos marcadores de superficie, responden de forma diferencial a la estimulación con citocinas, pero aún se desconoce cuales son los mecanismos involucrados en generar dichas diferencias.

Por esta razón, en el presente trabajo, se analizó la capacidad proliferativa y de expansión de células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> provenientes de SPM y SCU en relación con el estado del ciclo celular y el nivel de expresión de algunas de sus moléculas

reguladoras, tal es el caso de la Ciclina D tipo 3 (Ciclina D3), las cinasa dependiente de ciclinas tipo 4 (CDK4) y los inhibidores de cinasas de ciclinas (CDKI) bajo diferentes condiciones y días de cultivo.

## **II. Marco teórico**

### **II.1. *El origen de la hematopoyesis.***

El desarrollo de la sangre en los vertebrados ocurre en dos fases dependiendo del sitio de producción de células sanguíneas, la sincronización de la hematopoyesis, la morfología de las células producidas y el tipo de genes de globina involucrados. La primera fase, denominada transitoria o embrionaria (primitiva) es utilizada probablemente para proveer al embrión con células sanguíneas iniciales y con la formación de células capilares al saco vitelino, mientras que la segunda fase o fase definitiva (adulta) es usada para generar más tipos celulares y mantener a las CTH que pueden permanecer durante toda la vida del individuo (Marshall y Thrasher, 2001).

La hematopoyesis embrionaria esta asociada con los islotes de sangre en el mesodermo ventral, cerca del saco vitelino. Las CTH que permanecerán todo el tiempo de vida del organismo son derivadas del área mesodermal, alrededor de la aorta. Los estudios en mamíferos han demostrado que las CTH definitivas se forman cerca de la aorta, en un dominio llamado región aorta-gonada-mesonefros (AGM). Las primeras células de la sangre en los embriones de ratón aparecen en el mesodermo, alrededor del saco vitelino, pero en el día 11 las CTH multipotenciales pueden ser detectadas en la región AGM. Estas células colonizan el hígado fetal, y ahora se sabe que poco antes del nacimiento, las células troncales y progenitoras hematopoyéticas que colonizan el hígado y el bazo, llegan a poblar la MO, que en la etapa post-natal es el principal órgano hematopoyético (Dzierzak et al., 1998).

## **II.2. La proteína CD34.**

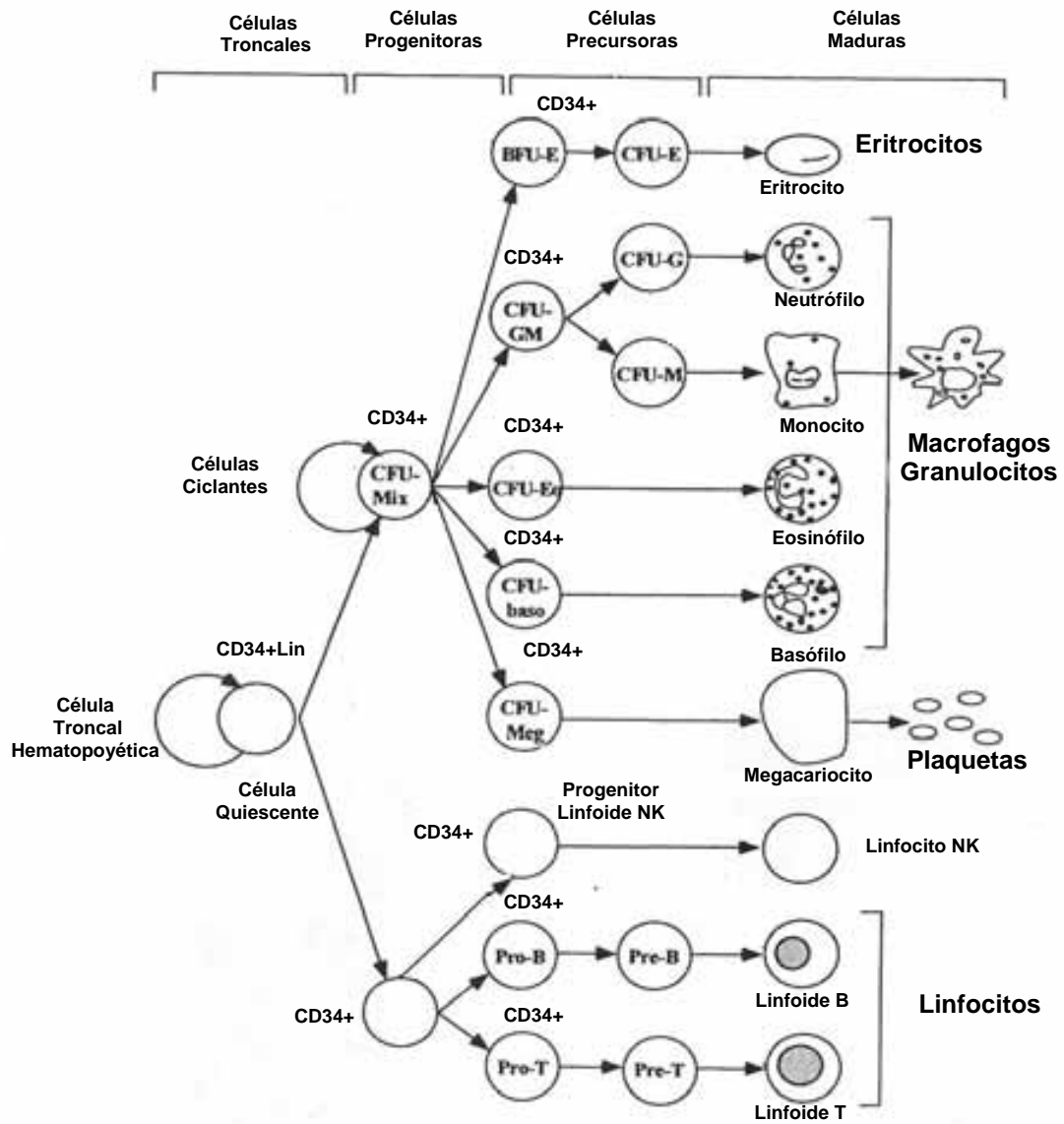
Las CTH y CPH, son las responsables de mantener la hematopoyesis prenatal y post-natal. Las células que funcionan como CTH definitivas en la SCU y la MO adulta, se caracterizan por la expresión del antígeno de superficie CD34. El CD34, es una sialomucina por su alto contenido de residuos de amino ácidos (aa) prolina, serina y treonina (20-55% de su composición de aa) y una alta concentración de carbohidratos unidos a oxígeno; es una glicoproteína transmembranal tipo 1 de superficie celular, que ha sido usada como un marcador para el desarrollo temprano de las CTH y CPH (Weissman, 2000). También se expresa en células progenitoras de hepatocitos, hueso, células estromales, fibroblastos embrionarios y en la vasculatura endotelial (Goodell, 1999). Una alta frecuencia de células CD34<sup>+</sup> se ha detectado asociada con el piso ventral del endotelio dorsal aórtico en la semana 4-5 del embrión humano, en un sitio asociado con la aparición de las CTH.

En el humano, el polipéptido maduro está compuesto de 354 aa y comprende 259 aa en el dominio extracelular, una región transmembranal de 22 aa y un dominio citoplásmico de 73 aa; tiene un peso molecular de 90 a 110 kDa. Se localiza en el cromosoma 1q32; este puede funcionar como un regulador de adhesión al estroma de la MO, o bien, como un receptor de señalización regulando negativamente la diferenciación y la proliferación de las CPH (Watt y Chan, 2001).

## **II.3. Organización del Sistema Hematopoyético.**

El sistema hematopoyético está organizado como una jerarquía de tipos de células clonogénicas, con diferentes capacidades para la autorrenovación, proliferación y diferenciación. De acuerdo a las características que presentan las células, el sistema hematopoyético se ha dividido en cuatro compartimientos (**Fig. 1**).





**Fig. 1. Organización del proceso hematopoyético.** El esquema muestra los 4 compartimentos en los que se divide la hematopoyésis: 1) Células troncales, 2) Células progenitoras, 3) Células precursoras, y 4) Células maduras que pasan a la circulación. **CFU-Mix:** Unidades formadoras de colonias mixtas (Eritrioides y Mieloides). **BFU-E:** Unidades formadoras de brote eritroide. **CFU-E:** Unidades formadoras de colonias eritroides. **CFU-GM:** Unidades formadoras de colonias de granulocitos y monocitos. **CFU-M** Unidades Formadoras de colonias de monocitos. **CFU-G:** Unidades formadoras de colonias de granulocitos. **CFU-Eo:** Unidades formadoras de colonias de eosinófilos. **CFU-ba:** Unidades formadoras de colonias de basófilos. **CFU-Meg:** Unidades formadoras de colonias de megacariocitos. Modificado de Takagi, 2005.

1) CTH. Como todas las células troncales, las CTH, son definidas operacionalmente por sus atributos funcionales, en este caso por el potencial para regenerar y mantener todas las células mieloides y linfoides totalmente diferenciadas que comprenden la sangre, la MO, el bazo y el timo (Dick et al., 1985). Las células troncales hematopoyéticas deben satisfacer tres criterios básicos. Primero: ser autorrenovables, ya que tienen la capacidad de dar origen a células con las mismas características funcionales que la célula original y en consecuencia ser capaces de restablecer la hematopoyesis *in-vivo* (Silvassy, 2003). Segundo: ser multipotentes, caracterizadas por el potencial para generar una progenie que representa al menos los ocho principales linajes hematopoyéticos: linfocitos T y linfocitos B; eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, basofilos/células cebadas; eosinófilos; neutrófilos/granulocitos y monocitos/macrófagos. Tercero: poseer un potencial de proliferación extremadamente alto, ya que se ha descrito que en humanos normales existen aproximadamente 50 millones de CTH, algunas de las cuales pueden generar hasta  $10^{13}$  células sanguíneas maduras.

Sin embargo, otra de las propiedades comunes de las células troncales es la quiescencia en términos del ciclo celular. Al menos, 75% de las CTH están quiescentes en la fase G0 en la MO (Bradford et al., 1997); mientras que el 97-98% de éstas células se encuentran en la fase G0/G1 en SCU (Traycoff et al., 1994). Aunado a lo anterior se ha descrito que las células hematopoyéticas más primitivas no presentan marcadores de linaje ( $\text{Lin}^-$ ) y mantienen una morfología que no corresponde a ninguna línea de diferenciación definida (blastos). El principal marcador usado para su aislamiento ha sido la molécula CD34, y a partir de células  $\text{CD34}^+\text{Lin}^-$  puede ser aislada otra subpoblación carente del antígeno CD38 conocida como  $\text{CD34}^+\text{CD38}^-\text{Lin}^-$ , que comprende a células troncales hematopoyéticas y representa menos del 0.2% del total de las células de la medula ósea (Bathia et al., 1998).

2) Células progenitoras hematopoyéticas (CPH), una población extremadamente heterogénea, que representa entre el 0.1-0.5% del total de las células presentes

en médula ósea. Las CPH son positivas al antígeno CD34 e incluyen células positivas y negativas a los diferentes linajes sanguíneos. Estudios *in vitro* han mostrado que estas células se caracteriza por su capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos, con un potencial proliferativo muy variable que puede ser bajo, intermedio o alto.

3) Precusores reconocibles morfológicamente, que representan más del 95% de las células residentes de la MO; ejemplos de estas células son: mieloblastos, promielocitos, mielocitos, eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromatófilicos, eritroblastos ortocromáticos, etc.

4) Células sanguíneas maduras, que cumplen alguna función específica dentro del organismo. Estas células incluyen linfocitos T y linfocitos B; eritrocitos, megacariocitos, plaquetas, granulocitos, monocitos y macrófagos (Morrison et al., 1997).

#### **II.4. *Microambiente hematopoyético.***

La descripción en mamíferos de diferentes sitios secuenciales de hematopoyesis durante la ontogenia, ha sugerido que ciertas células del microambiente juegan papeles clave para regular la proliferación y el comprometimiento celular hacia un linaje particular. El término microambiente hematopoyético, fue creado para distinguir diversos factores y elementos celulares que influyen una región microgeográfica de un órgano específico y en el caso particular de la hematopoyesis comprende áreas específicas de la MO en donde se encuentran las CTH.

En 1988 Owen definió al microambiente hematopoyético como un tejido estromal, formado por una red de células (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, adipocitos) y matriz extracelular (colágeno, laminina, fibronectina y proteoglicanos), los cuales mantienen físicamente a las células hematopoyéticas, y tienen una participación importante en la proliferación y diferenciación. Las células estromales contribuyen al microambiente hematopoyético, pero no todas las células del microambiente son células estromales.

En 1992, Mayani y colaboradores definen al microambiente hematopoyético como una red de células estromales (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos), células accesorias (linfocitos T, monocitos) y sus productos (matriz extracelular -colágeno, laminina, fibronectina y proteoglicanos- y citocinas), las cuales son capaces de influenciar la autorrenovación, la proliferación y la diferenciación de las CTH y CPH (Mayani et al., 1992). Los principales componentes del microambiente hematopoyético y sus efectos se enlistan en la **Tabla 1**.

## **II.5. Citocinas y hematopoyesis.**

El control de la hematopoyesis involucra interacciones entre CTH/CPH y elementos estromales, así como la regulación por citocinas solubles que pueden actuar localmente en el entorno de la MO o en sitios remotos. Estas moléculas participan en la viabilidad, proliferación, diferenciación y maduración celular durante el proceso hematopoyético. Actualmente existen más de 30 citocinas que han sido clonadas, las cuales estimulan la producción y/o función de las células hematopoyéticas (Mayani et al., 2003). Algunas ejercen su función sobre células troncales muy tempranas (factores hematopoyéticos de linaje no específico) y otras actúan sobre progenitores hematopoyéticos comprometidos hacia una línea determinada de diferenciación (factores hematopoyéticos de linaje específico) (Alexander, 1998).

Es interesante mencionar que las citocinas y los diferentes factores de crecimiento, llevan a cabo interacciones que pueden presentarse a través de vías de señalización intracelular aún sin la presencia de ligandos, a través de diferentes receptores transmembranales que comparten alguna secuencia de aa y que forman parte de una misma familia de receptores para factores crecimiento o citocinas, evento que da como resultado un efecto aditivo o sinérgico. Tal es el caso del efecto sinérgico generado entre el factor de células troncales (SCF) y la eritropoyetina (EPO) en la eritropoyesis a través de sus receptores (Sui et al., 1996).

| <b>Componente</b>                   | <b>Distribución</b>   | <b>Función</b>   | <b>Referencias</b>                                 |
|-------------------------------------|---|--|--|
| Fibroblastos                        | Mayor componente del microambiente hematopoyético.  | Producción de citocinas: IL-1, IL-6, SCF.<br>Secreción de colágenas I, III y IV. | Dorshkind, 1990;<br>Chabannon y Torok-Storb, 1992. |
| Células reticulares                 | Rodeando los sinusoides venosos.  | Regular la migración de células sanguíneas a la circulación.                     | Chabannon y Torok-Storb, 1992.                     |
| Adipocitos                          | Ocupan el mayor espacio de la médula ósea en mamíferos adultos (MO amarilla).                     | Se sugiere un efecto inhibitor de la hematopoyesis.                              | Chabannon y Torok-Storb, 1992.                     |
| Células endoteliales                | Revestimiento de todos los vasos sanguíneos.  | Homing. Producción de IL-6, G-CSF, GM-CSF, M-CSF.                                | Rafii et al., 1994.                                |
| Osteoblastos                        | Asociadas a la matriz ósea.   | Secreción de las citocinas inhibitoras TGF- $\beta$ e IL-1 $\beta$ .             | Chabannon y Torok-Storb, 1992.                     |
| Macrófagos                          | Considerados como células accesorias del microambiente hematopoyético.                            | Producción de TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-1, IL-3 e IL-6.                         | Rappolee et al., 1988.                             |
| Proteínas de la matriz extracelular | Elementos de la matriz extracelular: colágenas, proteínas fibrilares, proteoglicanos y lamininas. | Regulan la adhesión, diferenciación y autorrenovación.                           | Chabannon y Torok-Storb, 1992.                     |

**Tabla 1.** Elementos que forman parte del microambiente hematopoyético.

De esta forma la regulación de la hematopoyesis puede involucrar un amplio espectro de eventos intracelulares, que traen como resultado la proliferación, diferenciación, mantenimiento e inhibición de la apoptosis. Dentro de las principales citocinas reguladoras de la hematopoyesis (tanto estimuladoras como inhibidoras) se encuentran:

### **II.5.1. Factor de células troncales (SCF).**

El gen se ubica en el brazo largo del cromosoma 12, es conocido como factor de crecimiento de células cebadas, ligando de Kit y/o factor steel. El SCF es producido en forma soluble y transmembranal como producto del splicing alternativo. La forma transmembranal (248 aa), puede ser cortada proteolíticamente para generar la forma soluble (164 aa) (Anderson et al., 1990). El SCF es importante como regulador del mantenimiento e inhibición de la apoptosis, crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas en cualquier estadio de diferenciación, así como en el desarrollo de melanocitos y células de la línea germinal, durante el desarrollo embrionario y la vida adulta. También se encuentra involucrado en el “homing” de las células seminales a sus sitios apropiados de desarrollo (Roy-Keller y Linnekin, 2001).

Durante el desarrollo embrionario el SCF es expresado en células de la médula ósea, cerebelo y bulbos olfatorios, lo que sugiere un papel regulador en el sistema nervioso central. En el adulto se expresa en células endoteliales, monocitos, fibroblastos, epitelio intestinal, placenta, cerebelo, testículos, bazo y células de Sertoli. En el caso particular de las células hematopoyéticas, se ha encontrado en células CD34<sup>+</sup> humanas, puede actuar en sinergia con otras citocinas y factores de crecimiento, de esta manera promueve a la formación de diversas colonias hematopoyéticas, y mantiene la expansión o induce la proliferación de CPH. También logra mantener la supervivencia de las CTH y células comprometidas *in vitro* (Roy-Keller y Linnekin, 2001).

### **II.5.2. Ligando de la tirosina fetal 3 (Flt-3L).**

El gen que codifica a esta proteína se encuentra ubicado en el cromosoma 19q13.3 a partir del cual se pueden generar dos diferentes proteínas. La isoforma predominante, es una proteína transmembranal que puede ser cortada proteolíticamente para generar la forma soluble del Flt-3L (Pulendran y Dillon, 2001). Se expresa en diferentes tejidos, aunque su mayor expresión se detecta en células mononucleares de sangre periférica (SP); mientras que su receptor se encuentra restringido a CTH y CPH. El Flt-3L es una citocina que unida a su receptor (Flt-3R), estimula la proliferación de células hematopoyéticas (Brasel et al., 1995).

El complejo ligando/receptor estimula el crecimiento de las CTH y CPH, así como de los linajes linfoides y mieloides; además tiene un efecto sinérgico cuando se usa en combinación con otros factores de crecimiento como el GM-CSF, IL-3, SCF, IL-6, G-CSF, IL-1 $\beta$ , TPO, y EPO en células de MO, SCU y SP, para inducir la expansión y el crecimiento de colonias de células hematopoyéticas humanas (Brasel et al., 1996). Finalmente se sabe que en combinación con citocinas específicas induce timopoyesis, desarrollo de células Asesinas Naturales (NK-por sus siglas en inglés) y desarrollo de células B, además de que puede incrementar los progenitores megacariocíticos en CTH de SCU y SP (Pulendran y Dillon, 2001).

### **II.5.3. Trombopoyetina (TPO).**

El gen se localiza en el cromosoma 3q27-28 humano y se sintetiza en el hígado como una glicoproteína de 332 aa que es liberada a la circulación. Su función biológica la realiza al unirse a su receptor (c-mpl), que se encuentra localizado en plaquetas y megacariocitos. Estudios *in vitro* han mostrado que la TPO es capaz de estimular la megacariopoyesis, además que actúa sinérgicamente con FLT-3L y c-Kit para estimular un amplio espectro de eventos hematopoyéticos, particularmente en las CTH y CPH (Wendling, 1999).

#### **II.5.4. Interleucina 6 (IL-6).**

El gen se ubica en el cromosoma 7p21 y codifica a una proteína de 186 aa, con al menos cinco diferentes formas moleculares, con pesos moleculares que van de 21 a 28 kDa, ya que es modificada postraduccionalmente (Montero-Julian, 2001). La IL-6 es una citocina pleiotrópica, producida por diferentes tipos celulares, siendo sus principales fuentes macrófagos, fibroblastos y células endoteliales; aunque también es producida por células T, células B, monocitos, osteoblastos, células de la glia, queratinocitos y células de músculo liso (Astaldi et al., 1980). Para ejercer su función, la IL-6 se une a su receptor, que consiste de dos subunidades transmembranales: la subunidad  $\alpha$ , es una glicoproteína de 80 kDa que se une con baja afinidad a la IL-6, y la subunidad  $\beta$ , que corresponde a una glicoproteína de 130 kDa, que se une al heterodímero IL-6-IL6 $\alpha$ R para formar un complejo de alta afinidad que es capaz de inducir diferentes señales intracelulares (Montero-Julian, 2001).

Se sabe que la IL-6 promueve la proliferación de células B normales o leucémicas, e induce la producción de inmunoglobulinas. De igual forma es necesaria en la producción de anticuerpos por las mismas células B, y favorece la activación, crecimiento y diferenciación de células T. Finalmente se ha demostrado que es capaz de actuar como un factor de estimulación y regeneración del tejido hepático (Beagley et al., 1989).

Por otra parte, se ha detectado que la IL-6 en combinación con Interleucina 3 (IL-3), induce la proliferación de progenitores hematopoyéticos multipotentes. Además actúa sinérgicamente con el M-CSF para incrementar el número y tamaño de progenitores de tipo macrófágico (Montero-Julian, 2001).

#### **II.5.5. Interleucina 3 (IL-3).**

El gen se localiza en el cromosoma 5q23-31 y codifica a una proteína globular altamente glicosilada. La IL-3 es producida principalmente por linfocitos T, células NK, células cebadas y eosinófilos, y se une con baja afinidad a la cadena  $\alpha$  de su receptor el cual a su vez interactúa con la subunidad  $\beta$  para generar un



complejo trimérico de alta afinidad, encargado de transducir diferentes señales intracelulares, que inducen el crecimiento, diferenciación y supervivencia de células seminales y progenitoras hematopoyéticas, incluyendo progenitores comprometidos a linajes particulares, así como células maduras. También se ha encontrado que es capaz de estimular las funciones efectoras de células cebadas, eosinófilos, basófilos y macrófagos. La IL-3 en combinación con el CD40 estimula la producción de células dendríticas *in vitro*, y el crecimiento de progenitores B (Schareder, 2001).

#### **II.5.6. Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).**

El gen se encuentra en el cromosoma 5q31.1 y codifica a una proteína con peso molecular entre 14 y 33 kDa. El GM-CSF es producido por linfocitos T activados, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células estromales; asimismo, otros estudios sugieren una producción por linfocitos B, células cebadas, eosinófilos y osteoblastos. La proteína utiliza un complejo receptor que consiste de una cadena  $\alpha$ , a la cual se une con baja afinidad, y una cadena  $\beta$  (común con IL-3 e IL5), que al unirse con la cadena  $\beta$  y el GM-CSF forma un complejo de alta afinidad (Altmann et al., 1995).

El GM-CSF estimula la supervivencia de células formadoras de colonias hematopoyéticas de los linajes macrofágico, megacariocítico, neutrofílico y eritroide. De igual manera incrementa la actividad quimiotáctica de eosinófilos y neutrófilos, la expresión de moléculas de adhesión, la actividad fagocítica y la capacidad que tienen estas células para mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. En sinergismo con TNF- $\alpha$  estimula la proliferación y diferenciación de células dendríticas involucradas en la presentación de antígenos, y es capaz de estimular a los macrófagos a liberar citocinas, como: IL-1, G-CSF, M-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-6 y prostaglandinas (Nicola, 2001).

### **II.5.7. Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).**

El gen se localiza en el cromosoma 17q21-22 y da lugar a una glicoproteína de 20 a 25 kDa, que para ejercer sus efectos biológicos requiere de la interacción con su molécula receptora asociada a membrana (G-CSFR). Esta molécula es expresada por monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, aunque también se ha detectado en células de carcinoma escamoso, glioblastoma y hepatoma (Nagata, 2001).

El G-CSF estimula la formación de colonias de granulocitos en cultivos semisólidos de médula ósea, y a diferencia de otros Factores Estimulantes de Colonias, su efecto es más específico para el linaje granulocito neutrofílico, en donde además de prolongar la supervivencia, incrementa la capacidad funcional de las células maduras (Panopoulos y Watowich, 2008).

### **II.5.8. Eritropoyetina (EPO).**

El gen se presenta como una sola copia en el cromosoma 7q11-22 y codifica a una proteína globular de 34 kDa. La EPO se expresa principalmente en riñones e hígado, en donde es secretada por fibroblastos peritubulares y hepatocitos. Esta molécula también ha sido detectada en pulmón y testículo en condiciones normales. Sin embargo, en estado de hipoxia su expresión se incrementa y llega a ser incluso detectada en bazo (Spivak, 2001).

La principal actividad de la EPO, unida a su receptor de 55 kDa, es mantener la producción de células eritroides e inducir la supervivencia, proliferación y diferenciación de progenitores eritroides en la MO. Por otra parte, se ha encontrado que tiene efectos específicos dependiendo de su célula blanco, ya que en células progenitoras eritroides tempranas (BFU-E), la EPO actúa como agente mitogénico y promueve la proliferación, mientras que en progenitores eritroides tardíos (CFU-E), actúa como agente de supervivencia (Miyajima et al., 1999).

### **II.5.9. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).**

El gen se localiza en el cromosoma 6p21.1-21.3 y codifica a una proteína de 157 aa, con peso molecular de 17 kDa, es producido por un amplio número de tipos celulares, principalmente macrófagos, monocitos, células T, células B,

astrocitos, fibroblastos, células NK, células de músculo liso, células epidermales y diversas líneas tumorales (melanoma, próstata, páncreas y mama). El TNF- $\alpha$  se une a dos diferentes receptores: p60 (también conocido como p55, CD120a o tipo I) y p80 (denominado p75, CD120b o tipo II). El receptor p60 es expresado en todos los tipos celulares, mientras que p80 solo se expresa en células hematopoyéticas, células del sistema inmune y células endoteliales (Aggarwal et al., 1985).

El TNF- $\alpha$  es una citocina multipotencial que regula diferentes actividades biológicas dependiendo de su célula blanco, y es requerido para la protección contra infecciones bacterianas, la replicación viral, la modulación del sistema inmune, la regulación de choque séptico y enfermedades autoinmunes. En el caso del sistema hematopoyético, inhibe la eritropoyesis normal y leucémica (alterando la cinética del linaje eritroide), disminuye la expresión de receptores a G-CSF, del receptor c-kit, reduce la proliferación de colonias de granulocitos, monocitos y macrófagos. Específicamente en macrófagos, es capaz de incrementar la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, induce la expresión de GM-CSF, G-CSF e IL-1; el TNF- $\alpha$  reduce la unión y migración de linfocitos a través de células endoteliales. En las células endoteliales induce la producción de IL-1, G-CSF, GM-CSF, el receptor de IL-3 y estimula la expresión de moléculas de adhesión como: ICAM-1, VCAM-1, E y P-selectinas (Bradley 2008).

#### **II.5.10. Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ ).**

Pertenece a una familia de reguladores de crecimiento y diferenciación, la cual esta formada por 3 miembros: (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3), y codificados por genes únicos localizados en diferentes cromosomas (19q13, 1q41 y 14q24 respectivamente). Las formas bioactivas de TGF- $\beta$  tienen un peso molecular de 25 kDa, y están compuestas de dos cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro, que pueden formar homodímeros o heterodímeros, y pueden unirse a dos diferentes receptores (TGF- $\beta$ RI y TGF- $\beta$ RII), para formar un complejo de alta afinidad (Flanders y Roberts, 2001).

El TGF- $\beta$  es producido por células embrionarias, células mesenquimales, células epiteliales, cerebro y MO, no obstante, las fuentes más abundantes son el bazo, hueso y plaquetas. Tiene efecto pleiotrópico dependiendo del tipo celular y la concentración en la que se presente, pero en términos generales, es capaz de regular la proliferación y diferenciación celular, así como la producción y degradación de matriz extracelular. Asimismo, se ha observado que es capaz de regular la migración celular, la respuesta inmune y la respuesta inflamatoria. Se ha caracterizado como un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, endoteliales y neuroectodermales, y mantiene a las células en las fases G0-G1 del ciclo celular (Liu y Matsuura 2005).

En el caso de las células hematopoyéticas, el TGF- $\beta$ 1 es capaz de disminuir la frecuencia de las CTH y CPH, mediante la inhibición de su proliferación y la proliferación de progenitores hematopoyéticos tempranos, a pesar de la presencia de EPO, SCF, GM-CSF e IL-3 (Fortunel et al., 2003).

## **II.6. Fuentes alternas de células troncales hematopoyéticas (CTH) y células progenitoras hematopoyéticas (CPH)**

### **II.6.1 *Sangre de cordón umbilical (SCU) y Sangre periférica movilizada (SPM).***

Convencionalmente, la MO ha sido la fuente principal de CTH y CPH utilizadas con fines de trasplante. Sin embargo, en los últimos años células provenientes de SCU y SPM han sido utilizadas como fuentes alternas de CTH. Clínicamente se ha demostrado que las dos fuentes son capaces de inducir recuperaciones hematológicas, e incluso actualmente se acepta que las células provenientes de SCU tienen efectos comparables a las células provenientes de MO cuando se transplantan en niños.

Las primeras evidencias sobre la presencia de CTH y CPH en SCU fué sugerida por Knudtzon en 1974, pero fue Ogawa en 1987 quien demostró la presencia de células formadoras de colonias provenientes de SCU. Broxmeyer

determinó que la SCU es un recurso potencial de CPH al encontrar células formadoras de colonias multipotentes (Broxmeyer, 1989).

Por otro lado, la existencia de CTH en sangre periférica fue sugerida por Maximow en 1909, pero fue hasta 1962 cuando se demostró que células mononucleares (CMN) provenientes de SPM son capaces de reconstituir la hematopoyesis de ratones irradiados letalmente. A estos hallazgos siguieron trasplantes alogénicos con células provenientes de SPM en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) (Levin et al., 1963), Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y Linfoma de Burkitt. Subsecuentemente, las células de la SPM colectada durante leucaféresis y después de la estimulación con factores de crecimiento han sido empleadas con gran éxito no sólo en enfermedades hematológicas sino incluso en tumores sólidos como el cáncer de mama.

Desde el punto de vista hematopoyético las células troncales y progenitoras hematopoyéticas provenientes de las diferentes fuentes presentan importantes diferencias numéricas, ya que mientras en MO existen alrededor de 4% de células CD34<sup>+</sup> en la fracción de CMN, en SCU el número de células CD34<sup>+</sup> se reduce hasta un 2.5%, siendo mayor en SPM, en donde el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> llega a ser hasta del 20% (De Wynter et al., 1998). Sin embargo, a pesar del bajo número de células troncales, la SCU tiene importantes ventajas en relación con SPM y MO.

Entre ellas se encuentran:

1. Es un recurso abundante de CTH y CPH.
2. Su obtención no representa riesgo alguno para la madre o el neonato, ya que a diferencia de MO no es un método invasivo, ni se requiere la estimulación con factores de crecimiento como en el caso de SPM, lo que representa un incremento en los costos para trasplantes.
3. Su empleo no está asociado con cuestiones éticas relacionadas con células troncales embrionarias.
4. Existe una baja contaminación con Epstein-Barr y citomegalovirus, las cuales son comunes con trasplantes de MO (Cohen y Nagler, 2004).

**5.** Las CPH de SCU son capaces de generar todos los linajes hematopoyéticos (Mayani y Lansdorp, 1998; Mayani et al., 2003), y aunque las recuperaciones celulares después del trasplante son más tardadas que SPM y MO (Tse y Laughlin, 2005), la supervivencia a 2 años después del trasplante alcanza hasta el 68%, en relación con MO y SPM que muestran porcentajes del 28 y 38% respectivamente (Cohen y Nagler, 2004).

**6.** La SCU criopreservada y almacenada en bancos está disponible para la demanda, eliminando retrasos inevitables que suceden en el caso de la colección de la MO.

**7.** Puede ser fácilmente transportada y descongelada para usarse cuando sea requerida, ya que no tiene un tiempo de vida limitado, tal y como sucede con la MO recientemente donada.

**8.** La hematopoyesis y la función inmunológica generada por las CTH de la SCU en un paciente pediátrico transplantado, se puede mantener durante décadas, si se compara con las funciones de las CTH de un donador adulto. Esto debido, a que la actividad telomerasa es dependiente de la edad.

Es importante mencionar que aunque la SCU es una importante fuente de CTH y CPH, su empleo también representa los siguientes inconvenientes:

**1.** El volumen reducido de muestra (0.05-0.15 L), comparado con MO (0.9-1 L) reduce el número absoluto de CTH y CPH, lo que puede contribuir a una falla y un retraso del injerto hematológico del donador, un hecho que históricamente ha restringido su uso a pacientes pediátricos; aunque en años recientes el empleo de dos unidades de SCU se ha utilizado en adultos mostrando resultados satisfactorios (Chrysler 2004; Cohen y Nagler, 2004).

**2.** El desarrollo futuro de anomalías potenciales de las CTH del donador neonato en la vida adulta y sus efectos en el paciente transplantado es desconocido en el momento del trasplante.

**3.** No es factible coleccionar CTH adicionales del donador para pacientes que experimenten una falla del injerto.

## **II.7. Movilización de células troncales hematopoyéticas.**

Los factores de crecimiento hematopoyético más comúnmente utilizados para la movilización son: el G-CSF y GM-CSF; ambos factores están involucrados preferencialmente en la diferenciación de progenitores mieloides en monocitos y granulocitos maduros. El nivel de expresión de los receptores del G-CSF y el GM-CSF es muy bajo en los progenitores primitivos aunque se sabe que se incrementa durante la diferenciación (Lund-Johansen et al., 1999). Sin embargo, se ha demostrado que el receptor de G-CSF no es necesario para movilizar las células CD34<sup>+</sup> a la circulación, lo que sugiere que dicho factor de crecimiento no actúa directamente en las CTH y CPH, pero sí lo hace a través de las células del estroma de la MO en donde se ha demostrado su expresión (Liu et al., 2000).

El tratamiento de donadores sanos con G-CSF disminuye la función y la frecuencia relativa de progenitores de las células NK en la población de células CD34<sup>+</sup> contenidas en los productos de aféresis (Rondelli, 1998). Los productos de aféresis de donadores sanos tratados por una combinación de G-CSF y GM-CSF contienen significativamente (más del 50%) antígenos CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que los productos de aféresis de los donadores tratados con solo G-CSF (Volpi, 2001). En adición al G-CSF y el GM-CSF, otras citocinas tales como la IL-3, IL-8, IL-11, el SCF, el ligando de Flt-3, o la Proteína Inflamatoria de Macrófagos-1 tipo alfa (MIP-1 $\alpha$ ) pueden ser usados para la movilización de células CD34<sup>+</sup>. La capacidad de estas citocinas para movilizar las células a la SP cuando se usan como un simple agente, es similar que el G-CSF o el GM-CSF.

## **II.8. Papel de las moléculas de adhesión en la movilización.**

Las interacciones adhesivas entre las células troncales hematopoyéticas y los componentes del microambiente de la MO juegan un papel central en la migración, circulación y proliferación (Whetton y Graham, 1999). Las moléculas involucradas son los miembros de las integrinas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2, las selectinas y la familia de las super-inmunoglobulinas (Kinashi y Springer, 1994). Los ligandos correspondientes son expresados en células endoteliales y células accesorias de la MO o forman parte de la matriz extracelular en el microambiente de la MO.

Las  $\beta$  integrinas, los antígenos tardíos 4 [(VLA-4) CD29/CD49] y VLA-5 (CD29/CD49e) son de suma importancia para la adhesión de las CPH a componentes del estroma de la MO. Todos ellos regulan las interacciones entre las CTH y el estroma de la MO, la cual es de importancia funcional para la hematopoyesis, así como para la movilización y el injerto de las células CD34<sup>+</sup> (Hamamura et al., 1996). Las células CD34<sup>+</sup> circulantes expresan VLA-4 a bajos niveles, a diferencia de lo observado en las células CD34<sup>+</sup> residentes de la MO; lo cual sugiere que la liberación de las células CD34<sup>+</sup> y la capacidad para circular está relacionada a la presencia y al nivel de expresión de VLA-4 (Lichterfeld et al., 2000). Las moléculas de adhesión de células endoteliales tipo 1 y el CD44 son moléculas que se han asociado con la unión de células CD34<sup>+</sup> al estroma de la MO mediante la interacción con sus ligandos ácido hialurónico y fibronectina (Rösel et al., 1999). La L-selectina (CD62L), que regula el contacto inicial de leucocitos con el endotelio, es altamente expresado en células progenitoras circulantes CD34<sup>+</sup>, por lo que se le ha relacionado con el injerto de células troncales después del trasplante (Möhle et al., 1994).

Por otro lado, el factor 1 alfa derivado de quimiocinas estromales (SDF-1 $\alpha$ ) juega un papel esencial en la migración de células troncales, su receptor, CXCR-4 es expresado en las células CD34<sup>+</sup>. El SDF-1 es un quimioatrayente general para las células troncales hematopoyéticas, y la interacción SDF-1/CXCR-4 es importante durante el desarrollo embrionario, la hematopoyesis y la migración de las células troncales hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> (Aiuti et al., 1997).

La salida de las células CD34<sup>+</sup> a la SP puede no sólo depender del nivel de expresión, sino también del estado funcional de las moléculas antes mencionadas, ya que se ha postulado que la agregación de las plaquetas, la migración celular y el desarrollo embrionario puede modificar la actividad funcional de las integrinas. Asimismo, se ha descrito una reducción en el estado funcional del receptor VLA-4 en respuesta a la estimulación con G-CSF, o como resultado de una modificación en la concentración de iones Mg<sup>++</sup> en el entorno de la MO, hecho que se ha asociado con la movilización de células CD34<sup>+</sup> a SP (Rösel et al., 1999).



## **II.9. El ciclo celular.**

En 1838, Theidos Schleiden y Jacob Schwann propusieron, mediante la teoría celular, que todos los organismos vivos se componen de una o más células que proceden de la división de células pre-existentes, con lo que afirmaban que la división celular en cierta forma es una ruta a la inmortalidad (revisado en Murray y Hunt 1993). En los mamíferos, uno de los tejidos con mayor recambio celular, y por ende, donde la división es más común, es el tejido hematopoyético. Todas las células de la sangre se forman a partir de la continua producción de células progenitoras, que a su vez da lugar a células maduras. Así, nuestro organismo produce  $1 \times 10^{10}$  eritrocitos y  $4 \times 10^8$  leucocitos cada hora, durante la etapa adulta.

El ciclo celular es sin duda uno de los procesos biológicos más intensamente estudiados, y a pesar de los grandes esfuerzos realizados, aún quedan incógnitas de cómo éste es controlado por las diversas moléculas que participan en él. El ciclo celular es un término usado para describir una serie ordenada de eventos responsables de coordinar la duplicación del material genético y citoplásmico de una generación celular a la siguiente, y de asegurar la segregación balanceada del material genético en las dos células hijas.

En células eucarióticas el ciclo celular se divide en cuatro fases basados en eventos visibles o medibles, denominadas: G1, S, G2 y M. Así durante la fase G1, las células están sujetas a estimulación por mitógenos extracelulares y factores de crecimiento, las células transitan a través de G1 para proceder con la síntesis de ADN en la fase S; G2 es el intervalo entre la culminación de la síntesis de ADN y la mitosis (M). Esta última es visible al microscopio y comprende la citocinesis (división del contenido citoplásmico) y la cariocinesis (división del contenido cromosómico celular). Existe también un estadio denominado G0, el cual es usado para describir a las células que han salido del ciclo celular y permanecen en un estado de quiescencia, no proliferativo (**Fig. 2**). Las células en G0 difieren mucho de las que se encuentran en G1: en G0 disminuye el tamaño celular debido a un desequilibrio entre la síntesis y degradación de los componentes celulares, además de que las enzimas y el transporte transmembranal es bajo. Las fases G1, S y G2, son imperceptibles a la vista y constituyen la etapa denominada interfase

(Israels e Israels, 2001). Sin embargo, la conservación de los procesos de crecimiento celular y división pueden dissociarse en casos especiales: por ejemplo en los ovocitos, neuronas y células de músculo, puede existir el crecimiento celular sin división celular, y en huevos fertilizados, la división celular puede existir sin crecimiento celular, y estos eventos pueden funcionar en forma independiente o complementaria (Malumbres y Barbacid, 2001).

## **II.10. Reguladores del ciclo celular.**

Para que se puedan llevar a cabo los diferentes eventos de la progresión del ciclo celular que alterna procesos de proliferación y diferenciación, es necesaria la participación de diversas moléculas, que junto con las condiciones del medio, controlan la duplicación celular. Tal es el caso de las Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs). De acuerdo a las últimas versiones de los genomas de humano y de ratón, hasta el momento se conocen 11 genes que codifican para las Cdk, y otros 9 genes que codifican proteínas con similitudes estructurales conservadas (Thompson et al., 1997).

### **II.10.1. Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs).**

Las CDKs representan la subunidad catalítica de una gran familia de enzimas que promueven la fosforilación de residuos de serina/treonina. Las holoenzimas están formadas por complejos heterodiméricos con una de varias subunidades reguladoras denominadas ciclinas, las cuales han sido implicadas en el control de la progresión del ciclo celular. En 1991, en el Cold Spring Harbor Symposium on Cell Cycle, se decidió adoptar el término cinasas dependientes de ciclinas, de las que actualmente se conocen 11 miembros (Thompson et al., 1997) (**Tabla 2**).

La actividad de las CDKs en el ciclo celular es un proceso altamente controlado a diferentes niveles, además de requerir de subunidades activadoras (Ciclinas), también se unen a reguladores negativos (inhibidores de CDKs o inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI) y adicionalmente están sujetas a regulación por fosforilación y desfosforilación de la subunidad catalítica. Las CDKs pueden ser fosforiladas en residuos de treonina (T172 en CDK4 y T160

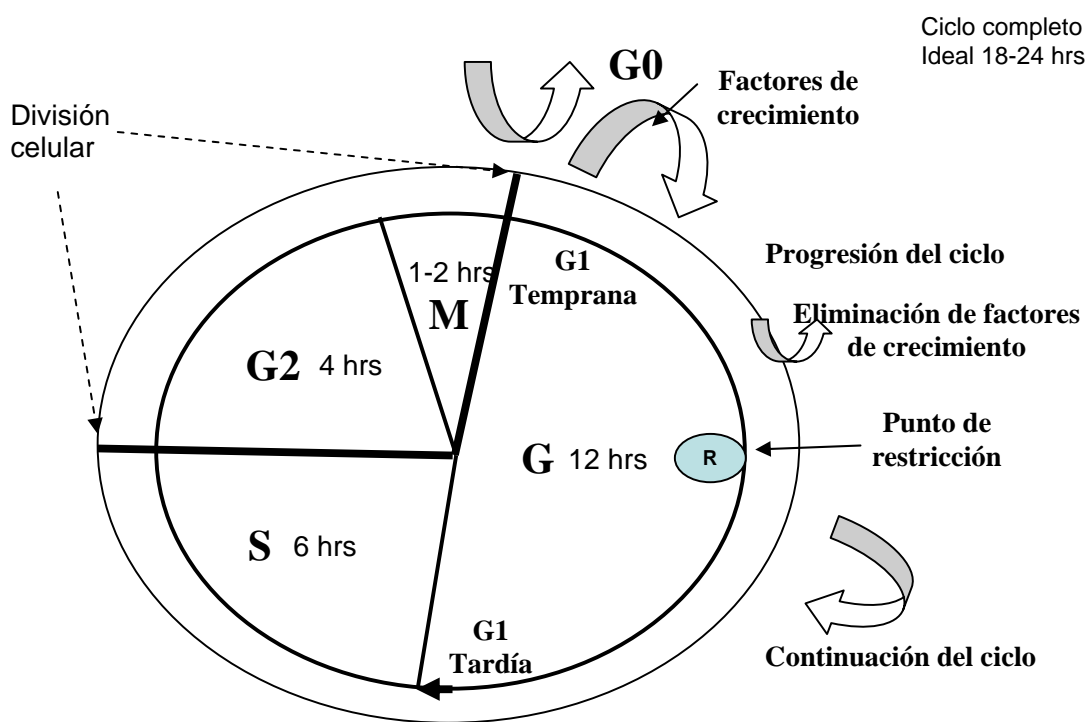


Fig. 2. El ciclo celular y sus diferentes fases.

en la CDK2) localizados en su asa "T" para llevar a cabo su propia actividad catalítica. Mientras que las cinasas Wee1 y Myt1 inhiben la actividad de cinasas de los complejos Ciclinas-CDKs, por la fosforilación de residuos adyacentes de tirosina y treonina en la subunidad de CDKs. La fosfatasa Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C) activa estas cinasas al desfosforilar los residuos de aa fosforilados por las cinasa Wee1 y Myt1. De esta manera podemos ver que los complejos Ciclina-CDKs requieren ser fosforilados en el asa "T" de la subunidad CDK por la cinasa activadora de CDKs.

Cuando ambas fosforilaciones, activadoras e inactivadoras existen simultáneamente en la misma molécula, las señales inhibitorias son dominantes y por lo tanto la cinasa carece de actividad, por tanto la fosfatasa Cdc25 es la responsable de la activación (Malumbres y Barbacid, 2001).

### **II.10.2. Ciclinas.**

Estudios realizados en huevos de erizo de mar identificaron una serie de proteínas que se sintetizan y se destruyen en cada una de las divisiones embrionarias, las cuales recibieron el nombre de ciclinas (Evans et al., 1983). Algunas de estas proteínas fueron subsecuentemente clonadas de embriones fertilizados de almejas y erizos de mar, y se observó que éstas promueven la meiosis en ovocitos de *Xenopus laevis* (Hunt, 1989).

Actualmente y de acuerdo al genoma humano, se han identificado, al menos, 29 genes que codifican proteínas relacionadas que comparten una región conservada de 150 residuos de aa designados "caja de ciclinas" (cyclin box). Este dominio esta formado por 5 regiones helicoidales y es responsable de la unión de supuestas proteínas de acompañamiento incluyendo las CDK (**Tabla. 2**).

De las 29 proteínas designadas formalmente como ciclinas, algunas no se asocian a CDKs o a otras cinasas, tal es el caso de las Ciclinas F, G, I, J, M, O y S. Sin embargo, el análisis de la secuencia del genoma humano ha identificado 7 locis adicionales que codifican a supuestas ciclinas de acuerdo a la secuencia homóloga a la caja de ciclinas. No obstante, hasta el momento no se han descubierto sus funciones.

| CDK | CICLINAS CON LAS QUE SE ASOCIA   | ACTIVIDAD EN LAS FASES DEL CICLO CELULAR | SUSTRATOS                                  | REFERENCIA  |
|-----|----------------------------------|--|--|---|
| 1   | A1, A2, B1, B2, B3, E            | G2/M                                     | HISTONA H1, p53, Rb, VIMENTINA.            | Malumbres y Barbacid, 2005.<br>Conget y Mingell 2000. |
| 2   | A1, A2, E1, E2<br>D1, D2, B1, B3 | G1-S                                     | B-Myb, p21, p27, p53, p107, pRb, Smad3.    | Aleemet et al., 2005.<br>Malumbres y Barbacid, 2004.  |
| 3   | E1,F2,A1,A2, C, D                | G0-G1-S                                  | CABLES 1                                   | Ren y Rollins, 2004.                                  |
| 4   | D1, D2, D3                       | G1-S                                     | p107, p130, pRb, Smad3.                    | Malumbres y Barbacid, 2005.                           |
| 5   | p35, p39<br>(D-E y TIPO G)       | SENECENCIA                               | Inhibidor de proteína fosfatasa 1, STAT 3. | Lilja et al., 2004.<br>Zhang et al., 2004.            |
| 6   | D1, D2, D3                       | G1-S                                     | p107, p130, pRb                            | Malumbres y Barbacid, 2005.                           |
| 7   | H                                | CINASA ACTIVADORA DE CDK                 | CDK-CDK6, p53, RNA polimerasa II.          | Lolli et al., 2005.                                   |
| 8   | C                                | TRANSCRIPCION                            | RNA polimerasa II.                         | Akoulitchev et al., 2000.                             |
| 9   | K, T1, T2                        | TRANSCRIPCION                            | pRB, RNA polimerasa II.                    | Garriga y Graña, 2004.                                |
| 10  | Factor Ets2                      | G2-M,<br>TRANSCRIPCION                   | ¿?   | Kasten et al., 2001.                                  |
| 11  | L1, L2 (D)                       | M, TRANSCRIPCION                         | Ciclina L.                                 | Loyer et al., 2005.                                   |

**Tabla 2. Complejos formados por las Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs) y las Ciclinas.** Se muestra la interacción formada por las ciclinas-Cdks y los sitios de unión, así como sus respectivos sustratos en las diferentes fases del ciclo celular.

### **II.10.3. Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI).**

Los CDKI juegan papeles clave en la regulación de la proliferación celular, a través del control que ejercen sobre transiciones críticas del ciclo celular y como efectores de vías de transducción que actúan en puntos de control del ciclo celular (checkpoints). Su importancia se ha puesto de manifiesto al encontrar que formas deficientes de estos inhibidores se asocian con el desarrollo de tumores. Su actividad es altamente controlada a través del ciclo celular y en respuesta a varias señales. Mientras que algunas de estas proteínas inhibidoras se expresan y funcionan de manera constitutiva como p16, otras como p27 se expresan en respuesta a condiciones del medio ambiente y detienen el ciclo celular de manera transitoria. La regulación generalmente afecta el nivel o la disponibilidad de los CDKI que pueden cambiar sus actividades intrínsecas. Los mecanismos que controlan la función de los CDKI incluyen: 1) regulación de la transcripción, 2) regulación de la traducción y 3) proteólisis. Algunas señales cambian la capacidad de los CDKI para interactuar con sus blancos específicos (Peter, 1997).

Los CDKI que gobiernan estos eventos han sido asignados a una de las dos familias basadas en su estructura y blancos de CDKs. La primer familia incluye a las proteínas INK4, las cuales son nombradas de esta forma por su capacidad de inhibir específicamente la subunidad catalítica de las proteínas monoméricas CDK4 y Cdk6, formando complejos binarios y esta formada por cuatro proteínas: p16<sup>INK4</sup>, p15<sup>INK4</sup>, p18<sup>INK4</sup> y p19<sup>INK4</sup>. Las cuatro proteínas comparten una identidad de aproximadamente un 40% y bioquímicamente son muy similares (Parry et al., 1999; Thullberg, 2000). No obstante, se sugiere que pueden tener un efecto inhibitorio formando un complejo ternario: INK4-CDK4-ciclina D, con la unión específica a la holoenzima, bloqueando el complejo. Análisis estructurales de los complejos p16-CDK6, p19-CDK6 y p18-CDK4 pudieron confirmar esto, ya que las proteínas INK4 se unen a regiones cercanas al sitio de unión de ATP del surco catalítico y opuesto al sitio de unión de ciclinas de CDK4 y CDK6, lo que induce un cambio conformacional que distorsiona la región catalítica y altera alostéricamente el sitio de unión de la ciclina D, favoreciendo su disociación (Jeffrey et al., 2000).

Los complejos ciclinas/CDKs pueden ser contrarrestados por inhibidores de acción más amplia que forman la segunda clase de CDKI, la familia Cip/Kip, cuyas acciones afectan las actividades de las CDKs asociadas a las ciclinas A, D y E. Esta clase esta formada por las moléculas: p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>. Cada una de las cuales contiene regiones características en el amino terminal que aumentan la unión, tanto a las ciclinas, como a las subunidades de CDKs. Estas moléculas forman complejos ternarios con la ciclina B-CDC2, ciclina A-CDK2, ciclina E-CDK2, ciclina D-CDK4 y ciclina D-CDK6 (Pei y Xiog, 2005).

Basados en un gran numero de experimentos *in vitro* y en los estudios de sobre-expresión *in vivo*, se ha demostrado que los CDKI de la familia Cip/Kip, interfieren con las actividades de las Cdkas asociadas a las ciclinas A, D y E. Trabajos más recientes han revelado que aunque las proteínas Cip/Kip son potentes inhibidores de la CDK2 dependientes de las ciclinas E y A, también actúan como reguladores positivos de las cinasas dependientes asociadas a la ciclina D (Roberts, 1999).

La expresión de genes inhibidores individuales de Cdk, es regulada por diferentes señales antiproliferativas tales como el daño al ADN por radiación ionizante, o la inhibición de la proliferación por la presencia del TGF- $\beta$ . El factor de transcripción p53 activa la expresión de inhibidores como p21. Por otro lado, la función de Rb, reprime la transcripción de p16, y el TGF- $\beta$  estimula la transcripción de p15 (Feng et al., 2000).

#### **II.10.4. El factor de elongación de la transcripción E2F.**

E2F es un miembro representativo de una familia de factores de transcripción E2 que actúan como efectores de la proteína del Retinoblastoma (Rb) y juegan un papel importante en la división del ciclo celular. Tales factores de transcripción se consideran como reguladores positivos de genes requeridos para la síntesis de ADN, aunque también pueden funcionar como represores de la transcripción que actúan en la proliferación y en la diferenciación, reguladores de la muerte celular, de la oncogénesis y la supresión de tumores (Cam y Dynlacht, 2003).

En células de mamífero, la actividad de E2F se genera por una amplia gama de complejos interconectados en donde participan siete genes de E2F, dos genes DP (DP1 y DP2) y tres genes que codifican a las proteínas de la familia de Rb (Rb, p107 y p130). E2F1, E2F2 y E2F3 (E2F3a) son potentes activadores transcripcionales, los cuales interactúan exclusivamente con Rb y se expresan frecuentemente durante el ciclo celular. E2F4 y E2F5 se expresan en algunos tipos celulares y funcionan como represores de la transcripción, ya que reclutan a las proteínas asociadas a promotores reguladores de E2F. E2F4 puede interactuar con los tres miembros de la familia Rb y E2F5 se puede unir sólo p130 (Dyson, 1998).

E2F3b es el complejo predominante E2F-Rb en algunos tipos de células quiescentes y funciona como un represor transcripcional (Aslanian, 2004). Los miembros E2F6 (en altos niveles de expresión retrasan la re-entrada al ciclo celular y reprimen los genes de respuesta a E2F) y E2F7 (se asocia con promotores de E2F durante las fases G2 y S del ciclo celular) tienen truncado el dominio de unión a las proteínas “pocket” y a la transactivación, por lo que bloquean la transcripción de forma independiente de las proteínas “pocket” (Trimarchi y Lees, 2002). Las proteínas presentan dos dominios de unión a ADN de forma independiente de DP, y los loci de E2F6 y E2F7 producen importantes RNAs con empalmes alternativos, los cuales codifican distintas isoformas de proteínas, ya que se han demostrado dos isoformas de E2F7 y dos y cuatro isoformas en humano y ratón de E2F6.

La función más ampliamente estudiada y mejor entendida de E2F es su capacidad para regular la transición de G1/S y la entrada a la fase S durante el ciclo celular (Kherrouche et al., 2004). Cabe mencionar que se han identificado una gran variedad de proteínas virales entre las que destacan el antígeno T grande de SV40, y la proteína E6 del papiloma virus humano (HPV-16), que compiten con los miembros de la familia E2F por su sitio de unión en la proteína Rb. La sobre-expresión de estas proteínas virales da como resultado un exceso de formas libres de E2F y que favorecen la entrada a la fase S.



### **II.10.5. La proteína del retinoblastoma (Rb).**

Rb es una proteína nuclear que pertenece a una familia de tres miembros, los cuales presentan múltiples sitios que son fosforilados por las Cdk. Rb se mantiene mínimamente fosforilada (hipo-fosforilada) en células quiescentes o G0, pero cambia a un estado altamente fosforilado (hiperfosforilada) durante la progresión de G1 y se mantiene así hasta el final de la mitosis.

Rb fosforilada libera al factor de transcripción E2F, permitiendo la expresión de algunos genes que codifican proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular y síntesis de ADN, incluyendo la ciclina E, la cual es requerida para la activación de la Cdk2. De esta manera, el complejo ciclina E-Cdk2 participa en el mantenimiento de Rb en un estado hiperfosforilado y participa en el proceso de retroalimentación positivo para la acumulación de E2F activo, como algunos otros complejos de ciclina-CDK, el complejo ciclina E-CDK2 fosforila la histona H1 y esta actividad puede ser importante para el rearrreglo de la cromatina, requerido durante la replicación del genoma (Tsai et al., 1998) y la duplicación del centrosoma (Lacey et al., 1999). En este evento, también participa un sustrato del complejo ciclina E-CDK2, una proteína nuclear llamada NPAT, la cual está presente en todas las etapas del ciclo celular y su fosforilación está implicada en la expresión de la histona, un proceso requerido para la entrada a la fase S (Zhao et al., 2000).

### **II.10.6. C-Myc.**

El gene c-myc es transcrito en una forma estrictamente dependiente de la proliferación celular, por lo que es considerado un importante regulador de la proliferación. C-myc es parte de una pequeña familia de 4 miembros relacionados entre si (c-, N-, L-, y s-myc) y B-myc; aunque este último carece de los dominios importantes para la función de las proteínas Myc. Las proteínas Myc son factores de transcripción de la familia de zipper de leucina y dominio helice-asa-helice, que activa la transcripción formando heterodímeros con las proteínas Max. C-myc es un factor transcripcional, involucrado en la carcinogénesis a través de su papel en

el control del crecimiento y la progresión del ciclo celular. Su sobre-expresión promueve la transición G1-S (Nasi et al., 2001).

#### **II.10.7. Punto de restricción.**

El término Punto de Restricción (R) fué acuñado en 1974 por Arthur Pardee, para definir un evento específico en G1 después del cual las células cultivadas pueden proliferar independientemente de un estímulo mitogénico. Las células cultivadas de mamífero que han sufrido mitosis tres horas previas, pueden ser detenidas de la progresión a través del ciclo celular por eliminación de factores de crecimiento o inhibición moderada de síntesis de proteínas. Estas células entonces re-entran al ciclo después de la re-estimulación con factores de crecimiento. Sin embargo, si las células tuvieron una división celular 4 h antes o más, ellas no responden a la falta del mitógeno y avanzan a través del ciclo con la misma cinética que las células que no son deprivadas. Ese fenómeno llevó a Pardee a postular que las últimas células habían pasado un punto de restricción (R) (**Fig. 2**).

R separa dos partes funcionalmente diferentes de G1 de células que están ciclando continuamente. Además no representa un punto de control o “checkpoint” como originalmente fue definido en levaduras. G1-pm representa el intervalo post-mitótico de G1 que perdura de la mitosis a R. G1-ps representa el intervalo prefase S de G1, que perdura de R a S. G1-pm es constante (duración aproximada de tres h) en los diferentes tipos de células estudiadas. G1-ps, sin embargo, varía considerablemente, indicando que la entrada a S no es seguida directamente después del paso a través de R. Ahora es usado para dividir las fases temprana y tardía de G1. En células en cultivo R ocurre 3 o 4 h después de la mitosis. Esta variabilidad es característica de la fase G1 tardía y explica algunas de las diferencias observadas a lo largo del ciclo celular.

La progresión a través de G1-pm requiere una continua estimulación por señales mitogénicas (factores de crecimiento) y una alta tasa de síntesis de proteínas. La interrupción de las señales mitogénicas o la inhibición moderada de síntesis de proteínas, conduce a una rápida salida del ciclo celular a G0 en células

normales. Luego de la re-estimulación mitogénica, las células regresan al mismo punto en G1-pm después del cual estas retornan al ciclo celular. Además la cinética diferencial de estas dos transiciones confirma diferentes mecanismos de control, en donde miembros de la familia de Rb, juegan un papel importante como frenos del ciclo que deben ser removidos (Zetterberg et al., 1995; Blagosklonny et al., 2002).

### **II.11. Fases del ciclo celular.**

El intervalo de tiempo de una célula de mamífero para progresar a través del ciclo celular y sufrir una división varía dependiendo del tipo celular, como una consecuencia de las diferencias en el tiempo invertido entre la citocinesis y el punto de restricción, pero en promedio éste dura aproximadamente 24 h. El tiempo usado por una célula para pasar de la fase S a M es extremadamente constante entre las células; dura aproximadamente 6 h para la fase S, 4h para la fase G2 y entre 1 y 2 horas para que se lleve a cabo la mitosis y la citocinesis; el resto es para transitar a lo largo de la fase G1 (**Fig. 2**) (Alberts et al., 1994).

#### **II.11.1. Transición G0/G1.**

El ciclo celular en mamíferos está altamente influenciado por señales externas durante la fase G0 y G1. La cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) es una de las más ubicuas vías de transducción de señales, la cual regula importantes procesos biológicos, que incluyen la progresión del ciclo celular. Esto a través de la expresión de las ciclinas del tipo D; las primeras ciclinas inducidas, que permiten a las células que salgan de G0 y rápidamente logren transitar a través del ciclo celular (Marshall, 1995; Lavoie et al., 1996). La vía Ras-MAPK también regula pos-transcripcionalmente las CDK, ya que puede intervenir en su ensamblaje y actividades catalíticas, en donde p21 y p27 además de su función inhibitoria, también participan en el ensamblaje de los complejos ciclina D-CDK4 y ciclina D-CDK6 durante la fase G1 temprana (Cheng et al., 1998).

Asimismo, se ha observado que células en ausencia de la ciclina D1 pueden proliferar indicando que esta molécula no es estrictamente necesaria para G1, ya que como los tres tipos de ciclinas presentan una alta homología y son co-expresados en algunos tejidos, es posible que tengan funciones redundantes; sin embargo, la ciclina D1 facilita el paso a través de G1 y promueve la proliferación celular (**Tabla. 2**). De igual manera, esta vía regula la síntesis de la familia de inhibidores CIP/KIP, ya que se ha demostrado que la estimulación con factores de crecimiento de células quiescentes causa la re-entrada del ciclo celular y la expresión transitoria de p21, la cual es dependiente de la actividad de MAPK.

### **II.11.2. Fase G1.**

La fase G1 originalmente fue definida como un intervalo de tiempo (Fase Gap) entre los eventos claramente observados de mitosis y síntesis de DNA. Este es un intervalo de tiempo que requiere de algunas horas, durante el cual las células están sujetas a estimulación por mitógenos extracelulares, factores de crecimiento, o inhibidores de la proliferación, los cuales determinan cuándo una célula quiescente puede iniciar la proliferación, una célula en G1 puede seguir ciclando o regresar a un estado quiescente (**Fig. 2**).

La progresión a través de G1 es regulada por un mecanismo complejo que involucra tres CDKs (CDK2, CDK4 y CDK6) con sus respectivos reguladores (tales como ciclinas e inhibidores). Posterior a la señal mitogénica, se induce la síntesis de la ciclina D y posiblemente el transporte de CDK4 y CDK6 al núcleo. Los complejos activos CDK4, CDK6 unidos a las ciclinas tipo D, son esenciales para el paso a través de la fase G1, y ellos ejercen su regulación en la progresión del ciclo celular, a través de la fosforilación de diferentes sustratos entre los cuales la proteína Rb juega un papel preponderante (Golias et al., 2004).

### II.11.3. Fase S.

En la fase S se lleva a cabo la duplicación de los cromosomas y del centrosoma, momento en que la célula se prepara para la división celular. En este momento existe un punto de control o checkpoint, que asegura que el ADN no presente alteraciones antes de la replicación. Se caracteriza por la expresión de las enzimas necesarias para la biosíntesis de purinas y pirimidinas y de la maquinaria de replicación, en donde destacan el antígeno de proliferación nuclear "PCNA" y la polimerasa de ADN. Durante esta fase se expresa el antígeno Ki67 cuya función se desconoce, pero sirve como un marcador de células proliferantes. La ciclina A también es regulada por E2F, y se acumula en la transición de la fase G1-S y persiste a través de toda la fase S. El inicio de la fase S correlaciona con la formación de los complejos ciclina A-CDK2, pero al final de la fase S la ciclina A se asocia con la CDK1 (**Fig. 2**). De esta manera, se puede observar que la ciclina A asociada a la actividad de cinasas, es necesaria para la entrada a la fase S, su culminación y entrada a la mitosis.

Debido a que el genoma eucariótico es extremadamente largo ( $10^7$  a  $10^9$  pares de bases (pb), la duplicación ocurre como un proceso simultáneo entre 10,000 y 100,000 sitios de síntesis paralelas, también denominadas orígenes de replicación (Nasheuer et al., 2002). Asimismo, se ha podido demostrar que el inicio de la replicación del ADN se lleva a cabo en dos pasos: el primero está dedicado al ensamblaje de los factores de iniciación al origen de la replicación, y el segundo consiste en la inducción de los complejos para activar la síntesis del ADN mediante la acción de proteínas cinasas. El origen de replicación del ADN, también llamado secuencia de replicación autónoma (ARS) contiene regiones consenso altamente conservadas de 100 a 200 pb, conocidas como secuencias consenso (ACS), las cuales son componentes esenciales del origen de replicación, que se une al complejo del origen de reconocimiento (ORC); hasta el momento, se han identificado 3 subunidades ORC en el humano HsORC1, 2 y 4 (Iizuka y Stillma, 1999).

Por otra parte, CDC6 es una proteína adaptadora clave para las interacciones del ORC, con diferentes proteínas como las del mantenimiento del

minicromosoma (MCM) en la replicación del ADN. Esta molécula se fosforila en el núcleo durante la fase S, por el complejo ciclina A-CDK2 y posteriormente se transporta al citoplasma (Findeisen et al., 1999). Las proteínas del MCM están formadas por un complejo de 6 proteínas relacionadas que forman un componente esencial del complejo de iniciación del ADN, éstas se asocian con la cromatina en la fase G1, y en la fase S son fosforiladas, por lo que se reduce su afinidad a la cromatina, lo que asegura que la replicación ocurra sólo una vez por ciclo. De igual forma, otras dos cinasas son importantes en el inicio de la replicación, tal es el caso de las CDKs y la cinasa Dbf4/CDC7, las cuales pueden asociarse con las proteínas del MCM (Ishimi, 1997).

#### **II.11.4. Transición G2/M.**

La fase G2 es la segunda fase gap en el ciclo celular en la cual la célula evalúa el estado del material genético replicado y se prepara para la fase M; en esta fase, el complejo ciclina B-CDC2 es el regulador mitótico clave de la transición G2/M. La síntesis de la ciclina B se inicia al final de la fase S, y hasta el momento se conocen 2 isoformas B1 y B2. B2 no es importante para el crecimiento y el desarrollo, ya que se asocia con el aparato de Golgi; mientras que B1 es responsable de algunas de las acciones de CDC2 en el citoplasma y el núcleo, y puede compensar la ausencia de B2. La CDC2 es fosforilada positivamente por la cinasa activadora de CDK (CAK) en la región conservada de Thr 160 y en la fase G2, el complejo ciclina B-CDC2, sin embargo se mantiene en un estado inactivo por la fosforilación de CDC2 en el residuo de Thr 14 que evita la unión de ATP y en el residuo de Thr 15, que interfiere con la transferencia del fosfato. El complejo nuevamente es activado después de la desfosforilación de estos sitios por la fosfatasa CDC25C (Sanchez y Dylcht, 2005).

### **II.11.5. Fase M.**

La mitosis involucra las etapas de cariocinesis (división del contenido cromosómico celular) y citocinesis (división del contenido citoplásmico), mismas que constituyen la fase más corta del ciclo celular eucariótico, ya que dura entre 1 y 2 h en células de mamífero. Esta fase comprende: Profase, Prometafase, Metafase, Anafase y Telofase.

Un evento relevante durante la mitosis es la ruptura de las láminas nucleares (A, B y C), las cuales están formadas por filamentos intermedios de lámina, localizados adyacentes a la cara interna de la envoltura nuclear. Durante la mitosis temprana, el Factor Promotor de la Maduración (FPM), constituido por la proteína cinasa de 34 Kda y CDK1 (p34<sup>cdc2</sup> /CDK1) unido a la ciclina B, (Complejo ciclina B-CDC2) fosforila residuos específicos de serina en las tres laminas nucleares, causando la despolimerización de estos filamentos intermedios. En esta etapa, se registra un incremento en los niveles de las ciclinas A y B de las cuales la primera puede formar complejos con Cdk1 o la proteína cinasa de 34 kDa (activa también en la mitosis en levaduras) para fosforilar sustratos ricos en residuos de serina y treonina. Además de la lamina nuclear, este complejo fosforila otros sustratos como la vimetina (constituyente de los filamentos intermedios que se extiende a través del citoplasma), y caldesmona (componente no estructural de los microfilamentos citoplásmicos).

El complejo p34/ciclina B induce la hiperfosforilación de la lámina y promueve el desensamblaje de la lámina nuclear y su ruptura. La reorganización del citoesqueleto en la fase M se produce por la fosforilación de la vimetina y caldesmona (Ferby et al., 1999).

El complejo ciclina B-CDC2, está involucrado en el inicio de diferentes eventos mitóticos, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Durante la profase, B-CDC2 está asociado con centrosomas duplicados y ésto promueve la separación del centrosoma por la fosforilación de la proteína Eg5, asociada al centrosoma. La ciclina B1-CDC2 y/o los complejos B2-CDC2 también están involucrados en la fragmentación del Golgi, por tanto, están relacionados en

reorganizar completamente la arquitectura celular durante la mitosis (Ookata et al., 1993).

De acuerdo a lo antes descrito, se puede observar que la progresión del ciclo celular es un proceso extremadamente complejo, en el que están involucradas un gran número de moléculas, las cuales cumplen con una función particular, en donde las diferentes señales externas pueden favorecer una progresión continua, división, paro del ciclo (ya sea por eventos de maduración y/o diferenciación), reparación de algún daño detectado en el ADN o la muerte; todo esto implícito en el tiempo de duración del ciclo celular, el cual es muy variable, y éste va a depender del tipo celular, de las condiciones del medio y el estado de maduración de las células. Un buen modelo de estudio, en donde se pueden observar los diferentes cambios presentes durante los procesos de proliferación y maduración celular, es el relacionado con las células troncales y progenitoras hematopoyéticas.

## **II.12. El ciclo celular en células troncales hematopoyéticas (CTH) y células progenitoras hematopoyéticas (CPH).**

Las CTH tienen la capacidad de renovarse indefinidamente, mientras poseen el potencial para diferenciarse en múltiples linajes. No obstante, *in vivo*, su tasa de proliferación bajo condiciones fisiológicas es mucho más lenta que la de su progenie intermedia, en las que se incluye a las células progenitoras y precursoras proliferantes. Las CTH en diferentes tejidos son gobernadas por programas genéticos que las mantienen en un estado conocido como "stemness". Una de las propiedades más comunes de las células troncales es la quiescencia en términos del ciclo celular. Al menos 75% de las CTH están quiescentes en la fase G0 en la MO (Cheshier, et al., 1999).

La quiescencia observada en estas células, asegura que la población de las CTH no se pierda bajo condiciones de estrés fisiológico y pueda mantenerse a lo largo de la vida de un individuo (Cheng et al., 2000), en lo que se ha denominado



“modelo de sucesión clonal” (Rosedaal et al., 1984). Recientemente se postuló, que la posición específica en el ciclo celular determina cuándo una célula primitiva funciona como una CTH o CPH, lo cual sugiere que el estímulo recibido en distintas fases del ciclo celular, puede llegar a provocar proliferación, diferenciación e incluso mantener a las células en estado de quiescencia (Quesenberry et al., 2002).

La quiescencia relativa de las CTH puede prevenir su prematura reducción numérica *in vivo*, pero ha sido considerada uno de los obstáculos en el contexto de la expansión *in vitro*, necesarios para el trasplante de CTH. En los últimos años, diversos estudios se han enfocado en encontrar las condiciones de cultivo (centrándose básicamente en el uso de diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas), que permitan expandir y mantener la población de las CTH, capaces de repoblar la MO de individuos inmunosuprimidos.

En células de mamífero, la maquinaria del ciclo celular que determina cuándo una célula puede continuar proliferando o puede detener su división y diferenciarse, opera ampliamente en la fase G1 y se ha demostrado que las dos familias de reguladores del ciclo celular (Cip/Kip e INK4), son esenciales en el arresto de la progresión del ciclo celular, en un amplio espectro de tipos celulares (Serr y Roberts, 1995).

En el caso particular del sistema hematopoyético, las primeras evidencias de la participación de diferentes reguladores de ciclo celular ha sido descritos en líneas celulares, tal es el caso de la línea celular mieloide M07e, en donde se ha descrito que el SCF y GM-CSF actúan de forma sinérgica e inducen la expresión de p21, que se asocia con CDK2, al tiempo que disminuye p27, evento que tiene como consecuencia un incremento en la capacidad proliferativa de las células, importante para el mantenimiento del compartimiento de las CTH y CPH (Mantel, 1996).

Asimismo, se ha descrito que en líneas celulares leucémicas como HL-60 y K562, el CDKI p21 participa activamente en la disminución de la proliferación, mientras que estimula la diferenciación celular (Zeng y e-Deiry 1996; Zhang et al., 1995). Cabe mencionar que en la línea K562, p21 es capaz de inducir la expresión

de p27, lo que sugiere una ordenada transición entre ambas moléculas, en donde cada una de ellas puede influenciar de distinta forma el proceso de diferenciación (Steinman et al, 2001). Eventos similares al anteriormente descrito, también han sido reportados en las líneas U937 (Steinman, 1994), MEG-01 (Uchimaru et al., 1998), CMK y UT27, y particularmente en las dos últimas se ha demostrado la diferenciación al linaje megacariocítico sin la participación de otros CDKI como p16, p15 o p18 (Matsumura et al., 1997; Kikuchi et al., 1997).

Otra línea celular en donde se ha demostrado la participación de p27 en el proceso de diferenciación es la eritroleucémica HB60-5, que en presencia de EPO es capaz de inhibir las actividades de CDK4 y CDK6, evento que se relaciona con su asociación a p27 y p15 (Tamir et al., 200). En la línea de células progenitoras mieloides de ratón 32Dcl3, la presencia de IL-3 las mantiene en un estado indiferenciado, debido a un incremento en la expresión de p21 y del receptor para IL3 (RIL-3), lo que produce un defecto en la maduración de linaje mieloides, ya que las células se mantienen como mieloblastos. Estas evidencias han sido correlacionadas con la patogenia de la Leucemia Mieloides Aguda (LMA) (Ghanem y Steinman 2006).

En lo referente a la hematopoyesis humana, se sabe que aunque la mayoría de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas se encuentran en las fases G0/G1 del ciclo celular, éstas no son iguales, ya que diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que dependiendo de su grado de aislamiento y purificación se pueden reagrupar en subpoblaciones que expresen diferentes antígenos de superficie con potenciales de diferenciación y proliferación variable (Mayani y Lansdorp, 1998; Verfaillie, 2000). Además las CPH que se encuentran en la fase G0 del ciclo celular tienen mayor potencial de proliferación que aquellas que se encuentran en la fase G1 (Summers et al., 2001).

Las variaciones en los potenciales de proliferación y diferenciación de CTH y CPH se han asociado con picos secuenciales de expresión de CDKIs, por ejemplo: un incremento en los niveles de expresión de p27, es seguido de un incremento en la expresión de p21, eventos que conducen a la diferenciación celular al tiempo que se asocian con una disminución de la proliferación celular

(Serr y Roberts, 1995; Parker et al., 1995; Durand, 1997). Asimismo, se ha demostrado *in vitro* que el nivel de expresión de p21 correlaciona con la proliferación de células CD34<sup>+</sup> mientras p27 permanece constante. Sin embargo, durante la diferenciación, p21 disminuye su expresión al tiempo que p27 cambia de localización subcelular sin modificar su nivel de expresión (Yaroslavskiy et al., 1999). Un hecho semejante ha sido reportado por Steinman et al (2004), quien demostró que en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU que permanecen en estado quiescente aún en presencia de citocinas, p27 se expresa de forma constante durante todo el cultivo, mientras que la expresión de p21 es muy variable.

Por otra parte, en células precursoras de SCU, se ha demostrado un incremento en el nivel de expresión de p21, relacionado con la maduración mieloide (Steinman et al., 1998), lo mismo que en colonias derivadas de células CD34<sup>+</sup> de SCU, MO y SPM, en donde se ha observado un incremento en el ARNm de p21 a través del tiempo, en granulocitos, macrófagos, megacariocitos y eritroblastos, mientras el nivel de expresión de p27 se mantiene bajo, excepto en las colonias explosivas eritroides. La proteína p27 es constante en megacariocitos y monocitos de SPM y MO y células plasmáticas (Baccini et al., 2001; Taniguchi et al., 1999).

En lo que respecta a p16, se ha detectado una alta expresión en las CTH de MO; sin embargo, su presencia disminuye en progenitores comprometidos y en relación con la entrada a la fase de síntesis del ciclo celular, similar a lo que ocurre en las CPH de SPM (Furukawa et al., 2000). De igual manera se ha observado que en cultivos prolongados, en donde se pierde la capacidad de las CTH, p16 y p19 disminuyen, lo que sugiere que la ausencia de estas moléculas juega papeles dominantes en la maduración de las CTH durante el cultivo (Stepanova y Sorrentino 2005), lo mismo que sucede en células CD34<sup>+</sup> normales, en donde el nivel de expresión de p15 se incrementa conforme avanza el grado de maduración hacia granulocitos y megacariocitos, pero no en células del linaje eritroide (Teofili et al., 2000).

En cuanto a p18, se sabe que su ausencia en CTH (de un modelo de trasplante de ratón), incrementa autorrenovación, así como el injerto a largo plazo,

lo que sugiere que p18 es un fuerte limitante del potencial de autorrenovación de las CTH *in vivo* (Yu et al., 2006).

La expresión *in vitro* de los diferentes reguladores del ciclo celular es influenciada por diversos estímulos extracelulares, y en el caso particular de los CDKI's, su expresión es altamente regulada por el inhibidor TGF- $\beta$ , que en células hematopoyéticas es capaz de reducir la expresión de receptores de citocinas en la membrana celular, tales como el receptor de la Interleucina-6 (RIL-6), receptor de c-Kit (Rc-Kit), del receptor del ligado de FLT3 y el receptor de Eritropoyetina (REPO), mientras promueve el incremento en la proteína p21, y de forma conjunta inducen el arresto del ciclo celular, manteniendo a las CTH y CPH humanas en las fases G0-G1 (Fortunel et al., 2003).

Asimismo, se ha demostrado que en células hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> humanas, la sola presencia de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1 en el cultivo, induce sobre-expresión de p27, sin alguna modificación significativa en el estado del ciclo celular y su capacidad de proliferación a corto plazo. Lo que ha demostrado la participación del TGF- $\beta$  en los mecanismos autócrinos de la regulación de la población de CTH, así como el papel de p27 (en altos niveles de expresión) en la inducción prematura a la diferenciación de progenitores, y la posible contribución a la pérdida del potencial de los precursores hematopoyéticos (Pierelli et al., 2000).

Toda la información anterior demuestra que para definir los mecanismos en la respuesta de las CTH se requiere del análisis de los reguladores de forma individual y así poder describir cómo estos reguladores interactúan con otras moléculas y generan diversas respuestas biológicas.

### III. Planteamiento del problema

Durante muchos años, la MO fue la fuente principal de CTH y CPH para aplicación clínica. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la SCU y SPM son fuentes adecuadas de CTH y CPH. Dichas células tienen altos potenciales de proliferación y expansión y son capaces de causar recuperaciones hematológicas cuando se usan en trasplantes.

Desde el punto de vista biológico, las CTH y CPH provenientes de MO, SPM y SCU son capaces de responder *in vitro* a la estimulación con diferentes combinaciones de citocinas, por lo que diversos grupos de trabajo alrededor del mundo han tomado esta propiedad como base, para tratar de expandir (con fines terapéuticos) a las CTH y CPH sin que pierdan sus características de células troncales, entre ellas la quiescencia celular. Los resultados generados al momento demuestran que las CTH y CPH provenientes de las tres fuentes tienen distintas capacidades de respuesta (SCU mayor proliferación y expansión que la MO y la SPM) a diferentes estímulos, por lo que es posible que los mecanismos de regulación del ciclo celular no sean los mismos.

De acuerdo con lo anterior, en este trabajo se pretende analizar el ciclo celular de CPH provenientes de SCU y SPM con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre la biología básica de estas células, ya que aunque en los últimos años han ocupado gran parte de la literatura científica, la información acerca de los mecanismos de regulación en el ciclo celular es muy limitada. Las interrogantes por responder son:

- ¿Existen diferencias en la duración o la regulación del ciclo celular en CPH provenientes de SPM y SCU?
- ¿Cuáles son las moléculas involucradas en los ciclos celulares de CPH de SCU y SPM, cuando las células son cultivadas por periodos cortos o largos y en presencia o ausencia de citocinas?
- ¿Si existe diferencias, éstas tienen relación con los diferentes potenciales de proliferación y expansión encontrados?

#### **IV. Objetivo general**

Determinar la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular y su relación con los procesos de proliferación en células progenitoras hematopoyéticas procedentes de SCU y SPM.

##### **IV.1. Objetivos Particulares**

-Determinar el estado del ciclo celular y la expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular p16, p21, p27, Ciclina D3 y CDK4 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> procedentes de SCU y SPM, en el momento de su obtención.

-Evaluar la progresión del ciclo celular y la expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular p16, p21, p27, Ciclina D3 y CDK4 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> procedentes de SCU y SPM durante las primeras 168 h (7 días) y a 14 y 21 días de cultivo en presencia de IL-3, IL-6, SCF, TPO, Flt-3, GM-CSF y G-CSF.

-Determinar el tiempo de doblaje de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> procedentes de SCU y SPM durante las primeras 168 h de cultivo, equivalente a 7 días, en presencia de IL-3, IL-6, SCF, TPO, Flt-3, GM-CSF y G-CSF.

## **V. Materiales y metodos**

### **V.1. Material biológico.**

Las muestras de SCU fueron obtenidas de nacimientos a término, tanto de cesáreas como de partos normales del Hospital General de Zona Troncoso del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Por otra parte, las muestras de SPM fueron obtenidas en el servicio de hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, mediante aféresis para trasplante alogénico de individuos adultos sanos (18-41 años de edad). El proceso de movilización de las células hematopoyéticas hacia la circulación fue logrado por la administración diaria del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos recombinante humano (rhGCSF; Filgrastim, Roche Switzerland) a una dosis de 10 µg/Kg/día, por 5-6 días consecutivos, la movilización se realizó entre el día 5 y 6. Las muestras de SCU así como las de SPM se obtuvieron de acuerdo con las Normas Institucionales y del Comité de Ética del Hospital General de Zona Troncoso y del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

### **V.2. Obtención de la población de células mononucleares (CMN).**

Para la SCU se utilizaron dos métodos de obtención: 1) después de la liberación de la placenta, se dejó que la sangre fluyera a lo largo del cordón y mediante goteo ésta fue recibida en un tubo estéril de 50 mL el cual contenía 500 µL de heparina (10,000 UI/mL) como anticoagulante. 2) Después de la liberación de la placenta, se usó una bolsa para colectar sangre (Industrias Plásticas Médicas, México) la cual contiene 37.5 mL de solución anticoagulante ACD (citrato trisodico, ácido cítrico, dextrosa y agua inyectable), y una aguja de calibre 16; esta fue introducida al cordón y mediante vacío se obtuvo la sangre. Las muestras fueron transportadas al laboratorio y procesadas el mismo día de la colecta. No se encontraron diferencias en el número de CMN ni de las CPH con los dos métodos de obtención de la sangre.

Las células del “Buffy Coat” de SPM y SCU fueron obtenidas por centrifugación a 400 g durante 7 min, para posteriormente obtener la población de células mononucleares de baja densidad (<1.077 g/mL), mediante gradiente de Ficoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suiza). Las CMN obtenidas fueron resuspendidas en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), con un pH de 7.2 y centrifugadas a 400 g por 7 min. Finalmente fueron resuspendidas en Medio Iscove’s modificado por Dulbecco (IMDM) suplementado al 2% con Suero Fetal Bovino (SFB) (StemCell Technologies, Inc., Vancouver Canadá). El número total de células viables, fue determinado mediante conteo con hemocitómetro, usando solución de Turk (que contiene ácido acético y libera los núcleos celulares, para que de esta forma se eliminen los eritrocitos y se cuenten sólo células nucleadas) y azul de tripano (GIBCO), respectivamente. En el caso de las células de SPM, a partir del concentrado leucocitario, se hizo directamente la separación de la población de CMN como se describió antes.

### ***V.3. Separación de la subpoblación enriquecida en CTH.***

Una vez obtenidas las CMN, la separación de la subpoblación CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de la SCU y SPM se obtuvo mediante el uso de una columna inmunomagnética, basada en el sistema de separación negativa (StemSep<sup>TM</sup>), el cual consiste de un coctel de 9 anticuerpos monoclonales: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66-β y Glicoforina A. Cien millones de células fueron incubadas por 15 min a temperatura ambiente en presencia del coctel antes mencionado; de esta forma todas las células positivas para los antígenos mencionados (células linaje positivas, Lin<sup>+</sup>) quedaron marcadas en la suspensión celular. Posteriormente fueron incubadas nuevamente por 15 min a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario, unido a un coloide magnético (StemSep<sup>TM</sup>); de esta manera se formó un complejo entre las células Lin<sup>+</sup> y el coloide. Finalmente la suspensión celular se hizo pasar a través de una columna inmunomagnética, la cual previamente fue balanceada con 8 mL de una solución de PBS. Luego de poner la suspensión celular en la columna, se hizo pasar a través de ésta 10 mL de PBS al 10 % de SFB; y a partir de éste momento, las células Lin<sup>+</sup>, quedaron



retenidas en la malla de la columna. Las células Lin<sup>-</sup> (subpoblación enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>) fueron colectadas en PBS al 10% de SFB. Las células fueron lavadas y centrifugadas; posteriormente la viabilidad fue contada mediante exclusión con azul de tripano y el número celular con diluyente de Turk en un hemocitómetro.

#### **V.4. Evaluación de los diferentes parámetros.**

Después de obtener la población enriquecida en células Lin<sup>-</sup>, se procedió a los diferentes análisis en el momento de la colecta, definidos como día cero del cultivo (D0), para lo cual, se tomaron diferentes alícuotas: la primera se utilizó para evaluar el estado del ciclo celular, la segunda se utilizó para analizar el nivel de expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular, la tercera se utilizó para evaluar la capacidad de las células progenitoras capaces de formar colonias, la cuarta se utilizó para evaluar el porcentaje de células positivas para el antígeno CD34<sup>+</sup> y la quinta para determinar la morfología de éstas mediante la tinción con Giemsa.

#### **V.5. Cultivos celulares.**

Cien millones de células de la subpoblación celular enriquecida en células Lin<sup>-</sup>, se incubaron en placas de 24 pozos, en medio de expansión StemSpan<sup>TM</sup> (medio IMDM suplementado con albúmina sérica bovina al 1%, 10 µg/mL de insulina pancreática bovina, 200 µg/mL de transferrina humana, 10<sup>-4</sup> M de 2-mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina -StemCell Technologies, Inc) en ausencia (control negativo) o presencia de citocinas hematopoyéticas: IL-3 (10 ng/mL), IL-6 (10ng/mL), TPO (10ng/mL), Factor Steel (SF, 10ng/mL), FL (10 ng/mL), G-CSF (20ng/mL) y GM-CSF (10 ng/mL), a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Luego de 7 días de cultivo, las células fueron cosechadas y se tomaron diferentes alícuotas como se describió antes. En este momento se incluyó una fracción más, la cual fue utilizada para obtener, mediante selección negativa, la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, que fue incubada con citocinas, bajo las condiciones antes mencionadas. Este proceso se realizó nuevamente los días

14 y 21 de cultivo; en éste último, se procedió como antes, pero ya no se cultivo la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>.

#### **V.6. Cultivos semisólidos.**

El numero de células formadoras de colonias (CFC) presente en los días cero, 7, 14 y 21 de cultivo fue evaluado mediante cultivos semisólidos. Para ello, 50,000 CMN o 5000 células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> fueron sembradas en metil-celulosa al 0.9% suplementada con 30% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1% de albúmina sérica bobina, 10<sup>-4</sup>M de de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 50 ng/mL de SCF, 10 ng/mL de IL-3, 10 ng/mL de GM-CSF y 3 UI/mL de EPO (Stem Cell Technologies). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en un ambiente saturado de humedad al 5% de CO<sub>2</sub> durante 14 días, al final de los cuales las colonias fueron evaluadas y clasificadas en los diferentes linajes hematopoyéticos:

-Linaje eritroide: Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU-E) y Unidades Formadoras de Colonias de Brote Eritroide (BFU-E): Colonias hemoglobinizadas con grupos celulares menores o mayores a 50 células respectivamente.

-Linaje mieloide: Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos (CFU-G): Colonias que contenían células granulocíticas; Unidades Formadoras de Colonias de Macrófagos (CFU-M): Colonias que contenían células macrofágicas; y Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM): Colonias que contenían células tanto granulocíticas como macrofágicas.

-Linaje Mixto (CFU-Mix): Colonias que presentaron células tanto mieloides como eritroides.

#### **V.7. Cuantificación de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> por inmunocitoquímica.**

Aproximadamente 35,000 a 40,000 CMN y de la subpoblación enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> obtenidas en el día cero (D0), así como las células sembradas en presencia y ausencia de factores de crecimiento, fueron cosechadas a los diferentes tiempos de cultivo, resuspendidas en PBS con 5% de SFB y posteriormente centrifugadas por 5 min a 1200 rpm en una citocentrífuga.

Las laminillas que contenían a las células se dejaron secar al aire y

posteriormente fueron fijadas con acetona a 4°C por 20 min; posteriormente se almacenaron a -20°C. Para el análisis, se utilizó un paquete comercial (DAKO En Vision+ System, Peroxidasa-Diaminobencidina, DAKO, Copenhague, Dinamarca) y un anticuerpo monoclonal específico contra el antígeno CD34 desarrollado en ratón (DAKO). Las laminillas se sacaron de -20°C y se dejaron descongelar, se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente se incubaron por 10 min con PBS 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; se lavaron nuevamente 3 veces con PBS y se incubaron por 30 min con el anticuerpo anti-CD34 (1:75 en PBS con 10% de SFB). Se lavaron las laminillas y se incubaron por 30 min con un anticuerpo secundario marcado con biotina, la cual reconoce la fracción Fc de los anticuerpos desarrollados en ratón; se lavaron 3 veces y finalmente se incubaron por 30 min en una solución de revelado la cual contenía un polímero conjugado con estreptavidina y peroxidasa, que reconoce la biotina del anticuerpo conjugado.

Las preparaciones se lavaron 3 veces y se incubaron por 10 min con diaminobencidina, que es oxidada por la peroxidasa para dar un precipitado color café en las células positivas al antígeno CD34. Las laminillas lavadas fueron contrateñidas con hematoxilina y se montaron para realizar el análisis (se contaron 300 células por laminilla).

#### ***V.8. Análisis inmunofenotípico de las células CD34 por citometría de flujo.***

Las CMN así como las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, fueron incubadas en PBS al 10% de SFB por 15 min, lavadas en PBS sólo y posteriormente se incubaron 15 min con un anticuerpo monoclonal específico contra la proteína CD34 conjugado con FITC (Caltag Burlingame, USA). Se utilizaron células sin anticuerpo como control negativo del experimento (auto-fluorescencia emitida por las células) y células con control de isotipo IGg1 (Caltag, USA). Las células fueron lavadas y fijadas con la solución comercial de Beckton-Dickinson (BD, San Diego, USA). Finalmente se adquirieron 30, 000 eventos en citómetro de flujo FACS Aria (Beckton-Dickinson, San José CA.).

### **V.9. Determinación de las fases del ciclo celular.**

Para determinar cada una de las fases del ciclo celular, las CMN, así como la subpoblación enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, tanto de SPM así como de SCU obtenidas tanto en el día cero (D0) como a los diferentes tiempos de cultivo, se analizaron mediante la tinción del ADN. Indistintamente fueron fijadas con etanol al 80% (Sigma, St. Louis, MO) y mantenidas a 0°C. Al momento de la evaluación, las células fueron descongeladas y lavadas con PBS a 4°C. Después fueron incubadas por 15 min en una solución de 40 UI/mL de RNAsa (Sigma, St. Louis, MO) y posteriormente con 1 µg/mL de Yoduro de Propidio (YP) (SIGMA, EUA) en PBS. La determinación de las fases del ciclo celular se realizó después de una h de incubación. Ésto se llevo a cabo cada día y a los diferentes tiempos de cultivo. Las señales de fluorescencia lineal del YP fueron analizadas mediante citometría de flujo en un Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA) con un mínimo de 30,000 eventos adquiridos. Los datos fueron almacenados y posteriormente analizados en un programa para ciclo celular (MultiCycle for Windows).

### **V.10. Detección de la expresión de las proteínas p16, p21, p27, Ciclina D y CDK4.**

Las CMN, así como la subpoblación enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> obtenidas en el día cero (D0), y las células sembradas en presencia y ausencia de factores de crecimiento, y cosechadas a los diferentes tiempos de cultivo, fueron permeabilizadas por 15 min usando el IntraPrep<sup>TM</sup> Permeabilization Kit-1 (Immunotech, Marseille, France). Las células fueron fijadas e incubadas por 15 min, y lavadas con PBS. Una vez realizado este procedimiento, las células se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos: anti-p16 conjugado con FITC, anti-p21 conjugado con FITC, anti-p27 conjugado con rodamina, anti-Ciclina D3 conjugada con Rodamina, anti-CDK4 conjugada con FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Las células fueron lavadas y resuspendidas en formaldehído al 1% para su posterior análisis citométrico. Se adquirieron 30, 000 eventos en citómetro de flujo FACS Aria (Beckton-Dickinson, San José CA.).

### **V.11. Análisis Morfológico.**

Aproximadamente de 35,000 a 40,000 CMN y de la subpoblación enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> obtenidas en el día cero (D0), así como las células sembradas en presencia y ausencia de factores de crecimiento, fueron cosechadas a los diferentes tiempos de cultivo, resuspendidas en PBS al 5% de SFB y posteriormente centrifugadas por 5 min a 1200 rpm en una citocentrífuga. Las laminillas que contenían a las células se dejaron secar al aire y posteriormente fueron teñidas con colorante Wright-Giemsa (Sigma Diagnostics, USA). Finalmente se analizó la morfología de las células.

### **V.12. Análisis estadístico.**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar del número de muestras indicadas. El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba *t* de student. La significancia estadística se asumió con valores de  $P < 0.05$ .

## VI. Resultados y discusión

Con la finalidad de entender y contribuir al conocimiento básico de la biología de las células de SCU y de la SPM, en relación a su capacidad proliferativa, se procedió a analizar y determinar la progresión del ciclo celular y algunas de las moléculas clave, reguladoras de dicho evento en una población enriquecida en células progenitoras hematopoyéticas ( $CD34^+Lin^-$ ).

### VI.1. Caracterización de las poblaciones de estudio.

Para el desarrollo del presente trabajo, se procesaron 16 muestras de SPM de donadores sanos adultos para trasplante alogénico, cuyas edades fluctuaron entre 18 y 40 años y 18 muestras de SCU de partos a término. Es interesante mencionar que no existieron diferencias significativas en cuanto al número de células obtenidas entre la colecta de la sangre a partir de cesáreas y parto normal, de la punción con aguja y bolsa de vacío, y de la colecta en tubos de 50 mL, como se describió en materiales y métodos.

En la **Tabla 3**, se muestran algunas de las características de los dos modelos de estudio: En el caso de la SPM se inició con un promedio de  $280 \times 10^6 \pm 192.5$  células MNC y en la SCU con  $135.6 \times 10^6 \pm 114.6$  CMN, las cuales fueron separadas mediante un gradiente de Ficoll. Posteriormente, se procedió a enriquecer a la población de células  $Lin^-$  mediante selección negativa, y se obtuvo:  $3.03 \times 10^6 \pm 4.21$  células en SPM y  $0.98 \times 10^6 \pm 1.1$  células en SCU. Es importante hacer notar que, en cuanto al porcentaje de recuperación no se observaron diferencias tan marcadas:  $0.84 \pm 0.83\%$  en SPM y en SCU  $0.71 \pm 0.69\%$  respectivamente, a pesar de que en SPM se inició con un mayor número de CMN.

Después de obtener la población de CMN, así como la enriquecida en células  $Lin^-$ , se procedió a evaluar el porcentaje de células que presentan el antígeno CD34, (mediante la técnica de inmunocitoquímica), y se observó un  $3 \pm 2\%$  en la población de CMN de SPM y  $2 \pm 1\%$  en SCU. Por su parte, en la población  $Lin^-$  se detectaron porcentajes del  $48 \pm 5\%$  en SPM y del  $55 \pm 12\%$  para SCU respectivamente. Se realizó la técnica de citometría de flujo para corroborar

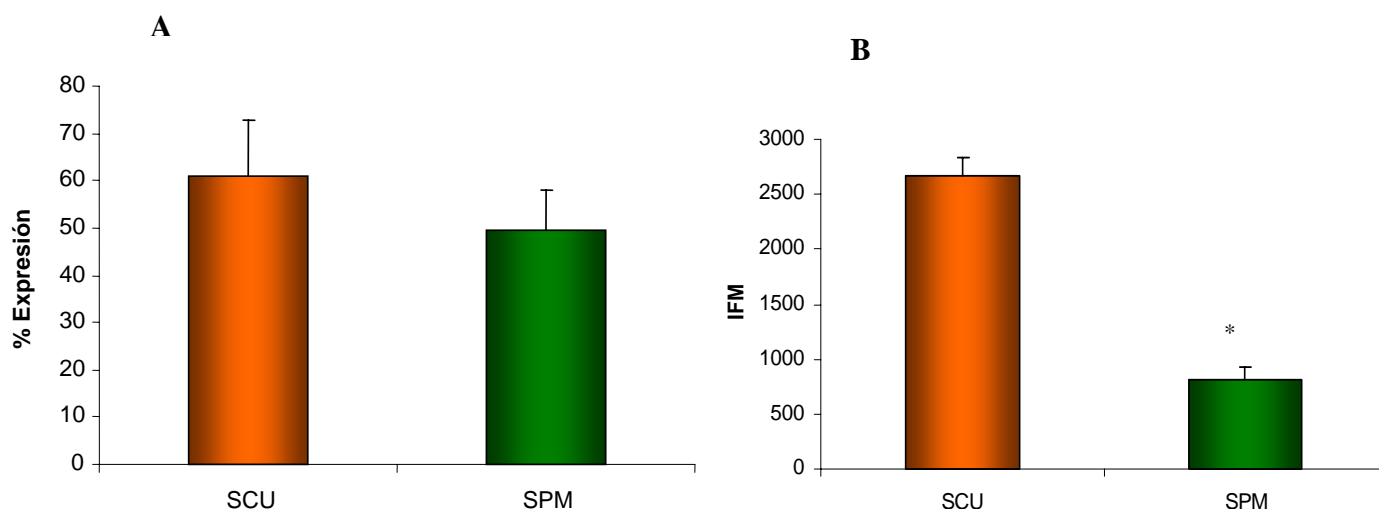
los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica, y se encontró que en células  $\text{Lin}^-$  de SPM existió un 49.5% de células que expresaron el antígeno CD34, mientras que en SCU 61% (**Fig. 3A**). Se decidió analizar la intensidad de fluorescencia media (IFM), con el objeto de evidenciar la fluorescencia promedio emitida por célula (en unidades arbitrarias), y se encontró que ésta fue mayor en SCU (2663) que en SPM (816) (**Fig. 3B**). Este dato fue muy interesante, ya que nos mostró una diferencia importante en cuanto a la frecuencia del antígeno CD34 en SCU con respecto a SPM.

Posteriormente se procedió a evaluar la capacidad que tienen estas células para formar colonias en cultivos semisólidos (característica particular de las células progenitoras hematopoyéticas). Los resultados mostrados en la **Tabla 3**, indicaron que en la fracción de CMN de SCU existían  $380 \pm 398$  CFC y en SPM  $180.7 \pm 156.5$  CFC. No obstante, luego de enriquecer a la población de CMN en células  $\text{CD34}^+\text{Lin}^-$ , la frecuencia de CFC se incrementó considerablemente en los dos modelos de estudio, esto con  $5781 \pm 3136$  en SPM y  $9515 \pm 4642$  CFC en SCU; lo anterior representó un enriquecimiento real de  $40.68 \pm 28.2$  veces en SPM, mientras que en SCU, el incremento fue de  $185.4 \pm 27.3$ . Lo que indicó ya desde un inicio, que la presencia de CFC en las células de SCU era superior a la de SPM.

|   | <b>SCU<br/>(n=18)</b> | <b>SPM<br/>(n=16)</b> |
|---|-----------------------|-----------------------|
| Pre-columna:<br>CMN (X10 <sup>6</sup> )               | 135.6 ± 114.6         | * 280.65 ± 192.5      |
| Pos-columna:<br>CD34 <sup>+</sup> (X10 <sup>6</sup> ) | 0.98 ± 1.1            | * 3.03 ± 4.21         |
| % Recuperación  | 0.71 ± 0.69           | 0.84 ± 0.83           |
| % CD34 <sup>+</sup><br>Pre-columna)                   | 2 ± 1                 | 3 ± 2                 |
| % CD34 <sup>+</sup><br>Post-columna                   | 55 ± 12               | 48 ± 5                |
| CFC-CMN<br>(X10 <sup>5</sup> )                        | 380 ± 398             | * 180.7 ± 156.5       |
| CFC CD34 <sup>+</sup><br>(X10 <sup>5</sup> )          | 9515 ± 4642           | * 5781 ± 3136         |
| Enriquecimiento<br>en veces                           | 185.4 ± 27.3          | * 40.68 ± 28.2        |

**Tabla 3. Datos generales de la subpoblación CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM y SCU en el día cero (D0).** Los datos representan el promedio y desviación estándar de 18 muestras de SCU y 16 muestras de SPM. Las CMN obtenidas por gradiente de Ficoll, que fueron enriquecidas en la subpoblación CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>. En ambas poblaciones se determinó el número de células positivas al antígeno CD34 (% de CD34<sup>+</sup>) y el número de Células Formadoras de Colonias (CFC) por cada 100,000 células sembradas en el día cero. El porcentaje de recuperación representa la cantidad de células obtenidas después de la selección negativa, en relación con las CMN que fueron consideradas como el 100%. El enriquecimiento representa a las CFC obtenidas en la población CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> dividido entre las CFC de la población de CMN. (n = número de muestras). \*Diferencias estadísticamente significativas en relación a SCU (P<0.05).





**Fig. 3. Expresión del antígeno CD34 en SCU y SPM.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU y de SPM, en el momento de la colecta fue incubada con anticuerpo monoclonal anti-CD34 conjugado con FITC. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó el porcentaje de expresión **(A)** y la intensidad de fluorescencia media (IFM) en unidades arbitrarias **(B)**. Se muestra el promedio de 3 experimentos. \*Diferencia significativa en relación a su contraparte en SCU (P<0.05).

Posteriormente se procedió a incubar a la subpoblación enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> en presencia de citocinas de acción temprana, intermedia y tardía, y en ausencia de éstas (Control). Ésto con la finalidad de evaluar su respuesta y capacidad proliferativa *in vitro*, en los dos estadios ontogenéticos del desarrollo (SPM y SCU). Por lo que las células fueron sembradas en presencia de las citocinas como lo descrito en materiales y métodos, y luego de 7, 14 y 21 días de cultivo, las células fueron cosechadas y contadas (población celular pre-columna) y una alícuota fue enriquecida nuevamente en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (post-columna), sembrada y/o analizada para determinar el número de CFC y su capacidad proliferativa. Sin embargo, en el día 21, la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> ya no fue sembrada, y sólo se analizaron los parámetros ya mencionados. Como se observa en la **Fig. 4**, las células de SCU, luego de 7 días de cultivo en presencia de citocinas, presentaron un incremento de casi 45 veces con respecto al día cero (Día 0), lo cual indicó un alto potencial en su capacidad

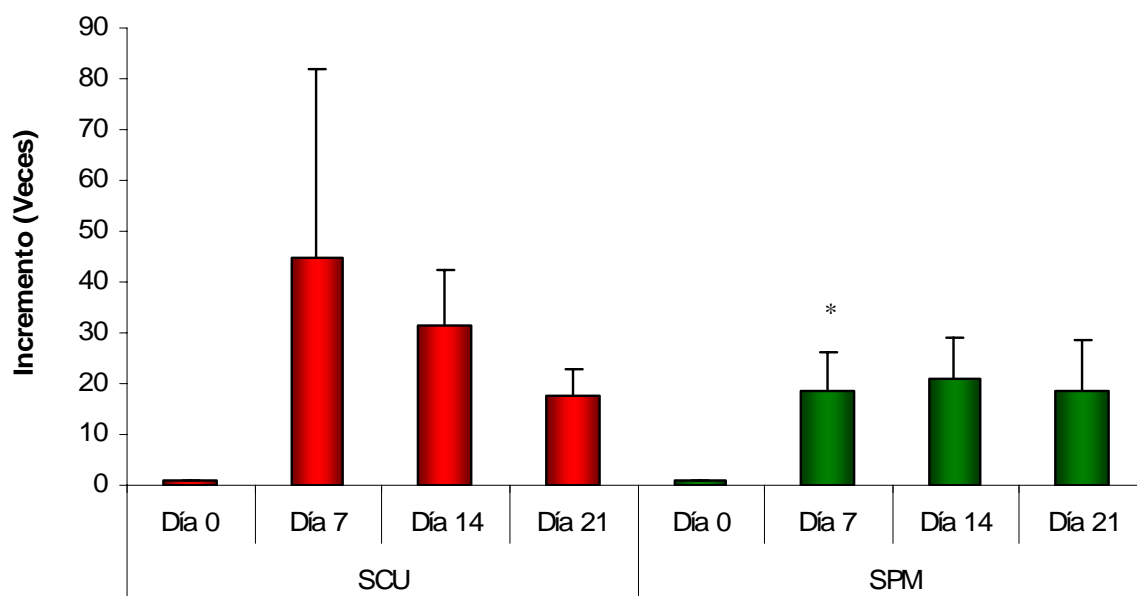
proliferativa; no obstante, luego de 2 semanas en cultivo, este potencial disminuyó, ya que el incremento en el número total de las células del día 7 al día 14 correspondió a 31 veces y finalmente, del día 14 al día 21 fue de 18 veces.

Por su parte, las células de SPM no tuvieron un incremento en su proliferación como el detectado en las de SCU, ya que en el día 7 se presentó un incremento total de 18 veces con respecto al día cero; asimismo, es interesante comentar, que a diferencia de las células de SCU, en donde sí hubo un incremento en la tasa proliferativa, en las de SPM, esta proliferación se mantuvo constante del día 7 al 14 y del día 14 al día 21 de cultivo, incremento similar a lo observado sólo en el día 21 en las células de SCU. Ésto correlacionó con lo reportado por estudios previos que demostraron que las células  $CD34^+Lin^-$  de SCU poseen un potencial proliferativo alto durante la primera semana de cultivo.

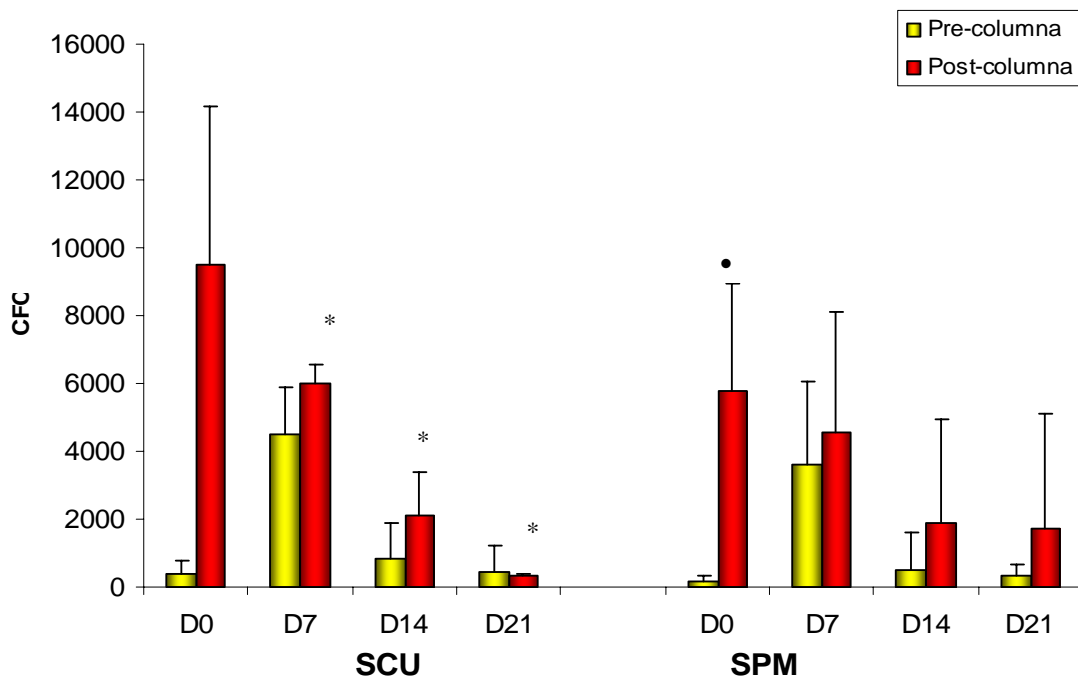
Además, se evaluó el número de células formadoras de colonias (CFC) en cultivo por cada 100,000 células sembradas. Esto, con el objeto de determinar el número y el potencial de las células progenitoras pre-columna y post-columna a lo largo del cultivo (0, 7, 14 y 21 días). En la **Fig. 5**, se puede observar cómo el número de células capaces de formar colonias tanto en SCU como en SPM disminuyó con respecto al día cero. No obstante, para el caso de las células de SCU, este potencial fue mayor que el observado en las células de SPM, ya que el número de CFC por cada 100, 000 células en el día cero, post-columna en SCU fue de  $9515 \pm 4642$ , y en SPM de  $5781 \pm 3136$ , con un enriquecimiento real en veces de  $185.4 \pm 273$  en SCU y de  $40.68 \pm 28.2$  para SPM. En el día 7 el número de células se redujo a  $6010 \pm 564$  en SCU y a  $4540 \pm 3576$  en SPM; sin embargo, no existieron diferencias significativas en cuanto al enriquecimiento real, ya que en SCU fue de  $1.5 \pm 0.70$  y en SPM de  $1.85 \pm 0.62$ . En el día 14, ya se detectaron diferencias en SCU  $21.43 \pm 27.34$  con respecto a SPM  $5.27 \pm 3.89$ . Finalmente, en el día 21, aunque el enriquecimiento fue mayor en SCU  $16 \pm 2.82$  que en SPM  $14.2 \pm 13.52$ , las diferencias no fueron significativas.

De acuerdo a los resultados mostrados, se pudo detectar, que existen grandes diferencias en el número de células capaces de formar colonias en cultivos *in vitro*; y este número es mayor en las células de SCU, a diferencia de las

de SPM en el día cero, lo que sugiere que los primeros días del cultivo son importantes para los procesos de expansión, y que en el caso de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, existe un mayor potencial de células formadoras de colonias.



**Fig. 4. Proliferación de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU y SPM.** Cien mil (100,000) células de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU así como de SPM en el día cero (Día 0), fue incubada en presencia de IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F TPO y FLT-3. Luego de 7 días de cultivo (Día 7), se evaluó el incremento en veces con respecto al Día 0, la población fue nuevamente enriquecida y sembrada en presencia de las mismas citocinas, luego de 7 días de cultivo (Día 14) se procedió como en el día 7, y así se llegó hasta el día 21. Los resultados representan el promedio de 7 muestras en SCU y 10 en SPM). \* Diferencia significativa en relación a su contraparte en SCU (P<0.05).



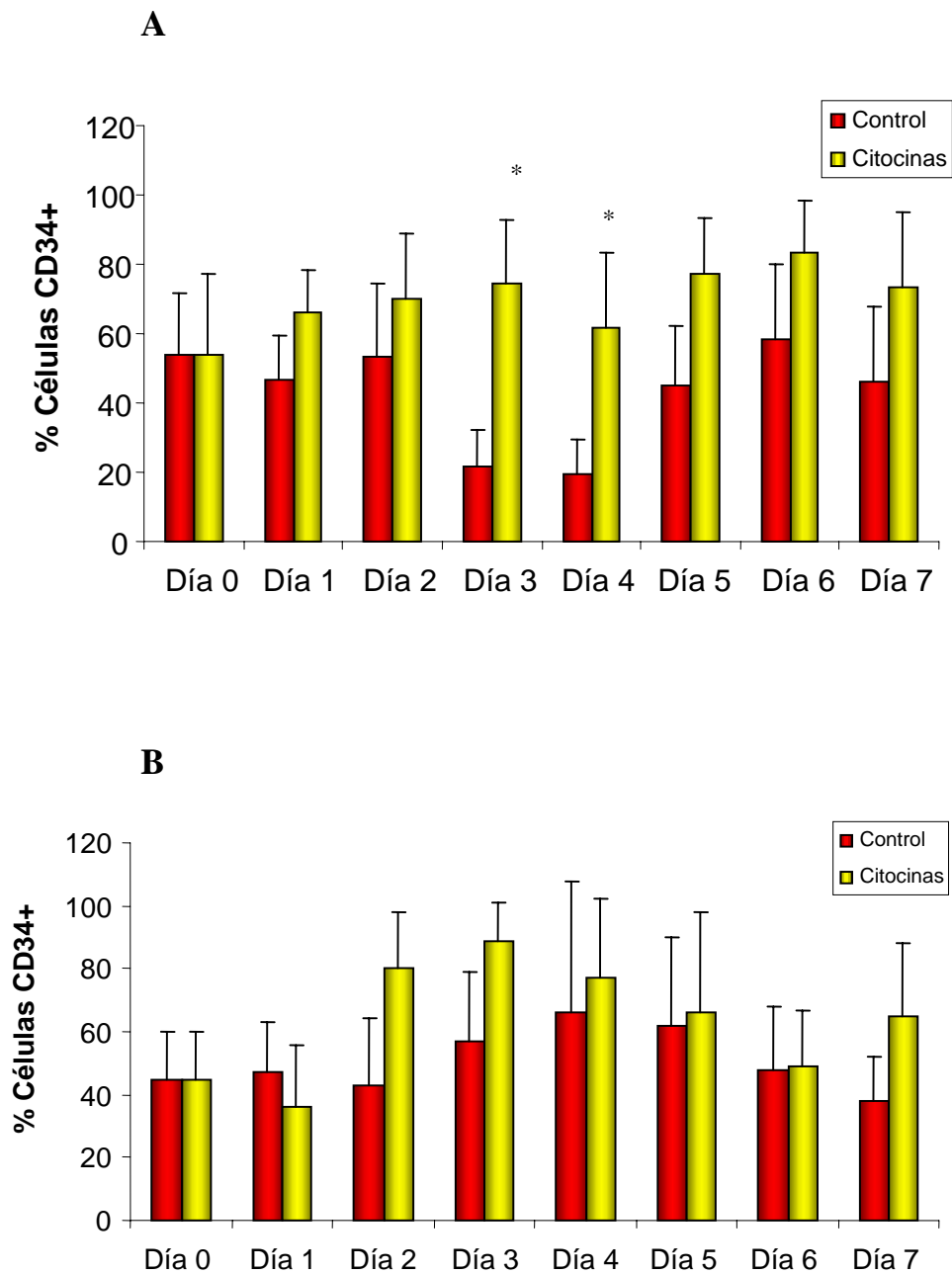
**Fig. 5. Células Formadoras de Colonias (CFC) en células  $CD34^+Lin^-$  de SCU y SPM.** Las células de SCU, así como de SPM antes (pre-columna) y después del enriquecimiento (post-columna) fueron cultivadas en metilcelulosa, la cual contiene 50 ng/mL de SCF, 10 ng/mL de IL-3, 10 ng/mL de GM-CSF y 3 UI/mL de EPO. Se muestra el promedio del número de CFC por cada 100, 000 células sembradas o colectadas a día cero (D0), D7, D14 y D21 de cultivo. \*Diferencia significativa con respecto al mismo tipo de fuente (SCU o SPM) a día cero ( $P < 0.05$ ). •Diferencia significativa con respecto a su contraparte de SCU ( $P < 0.05$ ).

De acuerdo lo anterior, se evaluó el nivel de expresión del antígeno CD34 cada 24 h durante los primeros 7 días de cultivo. Con el objeto de detectar variaciones en el nivel de expresión a lo largo del cultivo y su relación con la capacidad proliferativa y generadora de colonias. Se tomó por un lado, una alícuota de las células en cultivo en presencia de citocinas y por otro, una alícuota de las células en la condición control, tanto de SCU como de SPM. Las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal conjugado con fluorescencia específico contra la proteína CD34 y se adquirieron 30,000 eventos en citómetro de flujo. Los resultados obtenidos, indicaron que de acuerdo al porcentaje de células positivas a la molécula CD34, éste fue mayor en las células de SCU a D0 (55%) (**Fig. 6A**), con respecto a SPM (45%) (**Fig. 6B**).

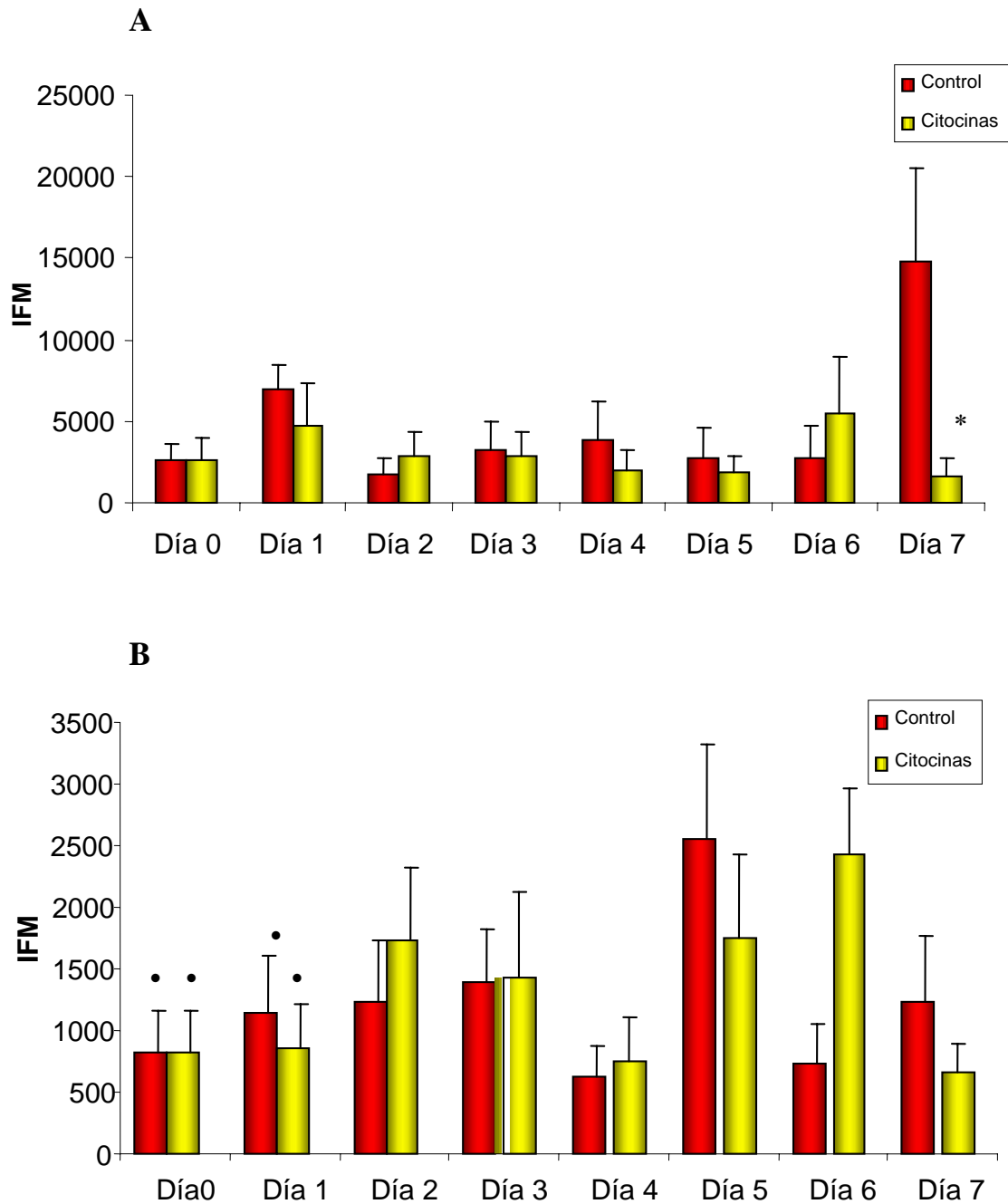
Sin embargo, después de 24 h de cultivo en presencia de citocinas, la expresión se incrementó a 66% en SCU y en SPM disminuyó a un 36%; en SPM, entre el día 2, 3 y 4 de cultivo, fue el tiempo en el que se detectó un mayor porcentaje de la población (80%, 89% y 77% respectivamente) que expresó el antígeno CD34, sin diferencias significativas. Luego de este tiempo, la población se redujo a 66% en el día 5, 49% en el día 6 y 65% en el día 7. En el caso de las células de SCU, en promedio el 70% de la población celular expresó el antígeno CD34 de forma constante entre el día 2 y el día 7 de cultivo, esto en presencia de citocinas, con un ligero incremento en el día 6 con 83% de las células sin cambios significativos. De acuerdo a lo anterior, se puede mencionar que el porcentaje de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU y SPM que fue positiva al antígeno CD34, se incrementa en relación al tiempo y que en el caso de SCU, ésta se mantiene alta y constante durante los 7 días de cultivo; y por su parte, en SPM el incremento se reduce del día 5 al día 7 de cultivo.

No obstante lo antes descrito, al evaluar la IFM de las células, se pudo observar que ésta es mayor en la SCU (**Fig. 7A**) con respecto a la SPM (**Fig. 7B**), desde el inicio del cultivo y ésta se mantuvo alta durante los 7 días en presencia de citocinas. De igual forma se detectó que las células de SCU cultivadas en la condición control, también mantuvieron una IFM mayor que la observada en SPM; ésto indicó que existe un mayor número de moléculas CD34 promedio expresadas por célula en SCU que en SPM.

Sin embargo, al hablar del porcentaje de la población celular positiva al antígeno CD34, en ambos modelos de estudio la expresión es muy similar.



**Fig. 6. Porcentaje de expresión del antígeno CD34.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU (A) y SPM (B), fue cultivada en medio de expansión libre de citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 24 h hasta 7 días de cultivo, incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la proteína CD34 conjugada con FITC. Se analizaron 30,000 eventos en citómetro de flujo y se graficó el porcentaje de expresión. Se muestra el promedio de 3 experimentos. \*Diferencia significativa con respecto a su contraparte sin citocinas (P<0.05).



**Fig. 7 Intensidad de Fluorescencia Media Emitida (IFM) del antígeno CD34.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU (A) y SPM (B), fue cultivada en medio de expansión libre de citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 24 h hasta 7 días de cultivo, incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la proteína CD34 conjugada con FITC. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la IFM. Se muestra el promedio de 3 experimentos. \*Diferencia significativa con relación a su respectivo control (P<0.05). •Diferencia significativa en relación a su contraparte de SCU (P<0.05).

### VI.1.1. Discusión

Los cultivos *in vitro* de CTH y CPH tienen como finalidad la generación de altos números celulares, y de acuerdo a las características de la combinación de las citocinas utilizadas, éstas pueden incrementar el número de células diferenciadas o bien tratar de mantener la población con un potencial y características de una célula inmadura con capacidades de autorrenovación o generación de los diferentes linajes hematopoyéticos.

De acuerdo con lo anterior, en estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado la respuesta proliferativa de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (mediante selección negativa), con un estímulo de diferentes combinaciones de citocinas por más de 21 días de cultivo, en SCU así como de SPM (Martínez-Jaramillo et al., 2004; Flores-Guzman et al., 2005).

En este estudio se decidió utilizar una estrategia metodológica para mantener una alta proporción de células con características semejantes a las iniciales, lo que se logró mediante un enriquecimiento secuencial de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> cada 7 días de cultivo, de las células que se generaron desde el día cero (D0) y hasta el día 21 de cultivo, ya que se ha demostrado que la continua separación de las células maduras del cultivo de CPH genera un alto incremento tanto en el número celular así como de las células funcionales capaces de generar colonias (CFC) (Flores-Guzman et al., 2006).

Para obtener un volumen considerable de la SCU (80 a 120 mL) y por lo tanto una gran densidad celular, fue necesario colectar la sangre del cordón en el momento del parto, ya que después del nacimiento del bebe, se inicia el proceso de la activación plaquetaria y coagulación, por lo tanto disminuye el volumen de sangre que se puede obtener del cordón, evento que se ve reflejado también en la disminución del número de CTH y CPH, lo que está directamente relacionado con el número de CMN por cordón. No obstante lo anterior, se encontró que en el momento de la colecta de SCU, la frecuencia de células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> fue similar a la obtenida en SPM, a pesar de que en ésta última el número de CMN es mayor (Upratya et al., 2003).



De igual manera se pudo demostrar que el número de células formadoras de colonias es mayor en SCU que en SPM y este evento se observa tanto en la población de CMN como de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (Martínez-Jaramillo et al., 2004; Flores-Guzman et al., 2005). Además, el enriquecimiento obtenido en SCU es tres veces mayor a lo obtenido en SPM.

Un punto interesante por comentar, es que al comparar la expresión del antígeno CD34 por inmunocitoquímica y FACS, se encontró un porcentaje mayor en SCU con respecto a SPM; sin embargo, al evaluar la IFM emitida por las células, se pudo detectar de una forma indirecta, que existe una gran diferencia en cuanto al número de moléculas CD34 presentes por célula en SCU con respecto a SPM.

No obstante lo anterior, el hecho de que las células de SPM expresen una IFM baja, podría sugerir que, la expresión de la molécula CD34 podría ser reversible, la cual va a depender del estado de activación de las células. Cuando llegan a un estado estacionario o fase de quiescencia en términos del ciclo celular, el antígeno CD34 podría o no ser expresado, además de que una significativa población de las células troncales hematopoyéticas humanas en el adulto podrían no presentar la proteína CD34, ya que estas se originan a partir de las poblaciones CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>; además de que en SCU y la MO de niños, la mayoría de las células troncales expresan el antígeno CD34 (Ogawa, 2002), indicando que en estados tempranos del desarrollo, la molécula es muy abundante y ésta disminuye de acuerdo a la edad de los individuos.

De la misma forma, sabemos que las CTH y CPH pueden o no expresar el antígeno CD34 en la membrana. Se ha detectado que éste se encuentra presente en vesículas localizadas en el citoplasma, situación que podría indicar una etapa de expresión temprana, lo que hace evidente los diferentes niveles de madurez que presentan las CTH y CPH (McGuckin et al., 2003).

En la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, de SCU y SPM, después de un estímulo de una combinación de diferentes citocinas, se observó un incremento en la expresión de la molécula CD34. Tal expresión fue mayor y constante en SCU a lo largo del cultivo, y en el caso de la SPM este aumento fue

transitorio, y no superó en general a lo observado en SCU, evento que podría estar relacionado con el paso a través del ciclo celular; o bien, con el hecho de que el antígeno CD34 en las células de SPM puede presentar una expresión diferencial que podría disminuir o incrementarse luego de 40 h de cultivo (Dooley y Oppenlander 2004). Esto fue demostrado al evaluar la IFM, en donde se encontró que las células de SCU expresan más moléculas del antígeno CD34 con respecto a SPM, lo que podría ser considerado como otra característica importante de células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> en aspectos relacionados con la capacidad proliferativa y de expansión de las células de SCU.

Como antes se mencionó, el potencial de proliferación que muestran las células de SCU en respuesta a una combinación de citocinas recombinantes, es significativo, comparado con la capacidad proliferativa de las células de SPM; sin embargo, esta respuesta se observó durante las primeras 2 semanas de cultivo. Esto correlaciona con estudios previos (Martínez-Jaramillo et al., 2004; Flores-Guzmán et al., 2005), lo que sugiere que estas diferencias podrían ser transitorias, pero nos aportan evidencias de cómo el estado ontogenético de donde provienen las muestras es determinante en la capacidad de respuesta de las CTH y CPH en cultivos *in vitro*; esto aunado a que se sabe que tienen una mejor capacidad de injerto (Summers et al., 2001).

Otro aspecto importante a evaluar en el caso de las CTH y CPH, es el relacionado con el mantenimiento de la capacidad formadora de colonias de diferentes linajes hematopoyéticos, visto desde el inicio del cultivo (D0) y a 7, 14 y 21 días. Similar a la capacidad proliferativa, y se encontró que en la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, existe un mayor número de células formadoras de colonias (CFC) que en SPM. Este dato correlacionó con lo reportado previamente y resulta interesante encontrar cómo este potencial se encontró en su pico máximo en los primeros días de cultivo.

A pesar del mantenimiento de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> mediante la selección negativa, a los diferentes días del cultivo, tanto en SCU como SPM, se observó una disminución en la capacidad proliferativa y de CFC, lo cual podría estar relacionado con un declive en el potencial

hematopoyético de las células CD34<sup>+</sup> que se presenta cuando las células son cultivadas y mantenidas *in vitro*. Bajo estas condiciones se puede evaluar la asociación entre la historia proliferativa, el destino celular, así como el de su muerte celular programada (apoptosis), ya que a pesar de que la gran mayoría son células CD34<sup>+</sup>, existen células capaces de mantener la hematopoyesis *in vitro*, y otras no, puesto que no necesariamente se dividen de forma simétrica. Lo que se puede correlacionar con el número de divisiones celulares (ciclos celulares) que una célula puede lograr, ya que las células que se dividen más de 4 veces podrían dejar de proliferar y morir. Sin embargo también puede existir un grupo de células que se divide 3 veces y mantenerse predominantemente en la fase G0/G1 del ciclo celular, lo que indica que el número de divisiones celulares también puede estar directamente relacionado con el proceso apoptótico *in vitro* (Traycoff et al., 1998).

De acuerdo a lo anterior, se puede ver que en las células CD34<sup>+</sup> per se, va a existir una heterogeneidad clonal, ya que no todas van a responder de la misma forma al estímulo generado por la presencia de citocinas, lo que va a marcar algunas diferencias en el potencial proliferativo, esto aunado con el hecho de que por ejemplo, en este estudio se trabajó con una población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, y en relación con lo descrito en la literatura, en donde se ha visto que el porcentaje de las células positivas o negativas para el antígeno CD34 que pueden mantenerse vivas, oscila entre el 30 y el 80%, y el porcentaje de las células que podrían perdurar durante todo el cultivo y hasta el día 21 sería muy reducido (entre el 1 y 5%) (Lansdorp et al., 1993).

En este aspecto es importante mencionar que la survivina, un miembro de la familia de los inhibidores de la apoptosis, se encuentra fuertemente expresado durante el ciclo celular en las CTH y CPH CD34<sup>+</sup>, que previamente han sido estimuladas por una combinación de citocinas, particularmente antes de que las células inicien el tránsito a través del ciclo celular, lo que sugiere que el incremento de ésta en las células CD34<sup>+</sup> podría mantener la sobrevivencia en cultivo de las CTH y CPH (Fukuda y Pelus, 2002). Por lo que podemos ver que una combinación de diferentes citocinas puede inducir una diversidad de efectos en la

proliferación, inhibición de la apoptosis, y la autorrenovación de las CTH en cultivos a corto plazo.

Respecto a la actividad de telomerasa, se ha logrado demostrar que ésta es muy baja en células primitivas hematopoyéticas humanas, específicamente en las células de la sangre, en donde se ha detectado un acortamiento del telómero durante la proliferación celular. En orden secuencial se ha visto que la actividad de la telomerasa es alta en las células CD34<sup>+</sup> de MO, seguida de la SPM, SCU y el hígado fetal (FL) y la longitud del telómero en las células CD34<sup>+</sup> es de 10.4 kbp, 7.4 kbp y 7.6 kbp en SCU, SPM y MO respectivamente. Por lo que aquí podemos correlacionar el comportamiento visto en la capacidad proliferativa vista en las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU con respecto a las de SPM, aunado al hecho de que la estimulación de las células CD34<sup>+</sup> con citocinas en forma individual induce una ligera actividad de telomerasa, pero la combinación de éstas la incrementa considerablemente, evento asociado con una disminución de la proliferación y la expansión celular (Engelhardt et al., 1997).

Las diferencias observadas en la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU con respecto a la SPM, indican que de acuerdo al estado ontogenético, la expresión del antígeno CD34 es mayor en SCU. Asimismo se ha demostrado que la expresión del antígeno CD34 en las CTH es reversible, por lo que es de esperarse que la proteína se encuentre internalizada en depósitos intracelulares en el citoplasma, o el ARN mensajero para la molécula CD34 pueda conducir a la célula a una rápida síntesis, o que nuevamente sea expresada en el momento en que la población celular sea activada a través de la presencia de factores de crecimiento. Se sabe que las células altamente quiescentes pueden expresar un nivel relativamente bajo del antígeno CD34, y la expresión puede ser sobre-regulada en respuesta a señales de proliferación, además la presencia de la molécula CD34, puede ser considerada como un marcador de células activadas, aunque no necesariamente de todas las CTH y esta activación podría representar la autorregulación o la proliferación asociada a la diferenciación (Goodell, 1999; Engelhardt et al., 1997).

De igual forma podemos suponer que la constante presencia del antígeno CD34 en los diferentes días del cultivo podría sugerir el mantenimiento de una fracción celular que se divide y mantiene la molécula CD34 en su superficie y otra que no se divide, aún en presencia de citocinas y que podría mantenerse por más de 10 días en cultivo (Traicoff et al., 1995).

La comparación biológica y celular en una población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de dos fuentes ontogenéticamente diferentes, a las cuales ya se les ha evaluado algunos parámetros como la capacidad proliferativa, de expansión, de células iniciadoras de cultivos a largo plazo y la expresión de antígenos de superficie, es un paso importante para evidenciar las bases celulares de su diferente respuesta biológica bajo las condiciones de cultivo establecidas en nuestro laboratorio. Sin embargo, en lo que respecta a aspectos moleculares, poco se conoce en las CPH y particularmente en la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de la SCU y la SPM. Por lo que se decidió evaluar un evento muy importante y que está muy estrechamente relacionado con la respuesta proliferativa, el ciclo celular, y en el caso particular de la población analizada en este estudio. Esto con la finalidad de detectar algunas diferencias en los elementos que participan en tal proceso, específicamente las moléculas reguladoras del ciclo celular.

## **VI.2. Ciclo celular**

### **VI.2.1. Fases del ciclo celular en el día cero.**

Una vez conocidos algunos aspectos generales de las células de SPM y SCU, se procedió a analizar el estado del ciclo celular, para determinar en que fases del ciclo se encontraban las células de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> en el momento de la colecta y conocer un poco más acerca de sus características a las cero horas (0 h) o día cero (D0) de cultivo. Para ello se tomó por separado una fracción tanto de CMN, como de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM y SCU, y se analizaron las fases del ciclo celular como se describe en materiales y métodos.

En la **Tabla 4**, se observa que un alto porcentaje de la población de CMN, así como de la subpoblación enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> se encontraban en las fases G0/G1 del ciclo celular. Específicamente para el caso de SPM, se detectó un  $92.8 \pm 3.9\%$  de CMN en la fase G0/G1, y en las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de  $86.6 \pm 7.1\%$ ; mientras que para las células de SCU con  $80.5 \pm 4.1\%$  y  $83.8 \pm 2.3\%$  respectivamente. En lo que se refiere a la fase S, se detectó un  $7.8 \pm 4.1\%$  en las CMN de SCU, superior a la SPM que se encontró en  $4.2 \pm 4.3\%$ ; no obstante, para el caso de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> en la misma fase, en ambos casos se encontraron diferencias significativas,  $9.1 \pm 3.5\%$  en SPM y  $3.4 \pm 2.1\%$  en SCU respectivamente. En las fases G2/M los resultados fueron muy similares en SPM, ya que en las CMN se obtuvo un  $2.9 \pm 3.1\%$  y en las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>  $4.3 \pm 6.14\%$ , mientras que para las de SCU fue de  $11.7 \pm 3.1\%$  y  $12.8 \pm 3.4\%$  respectivamente.

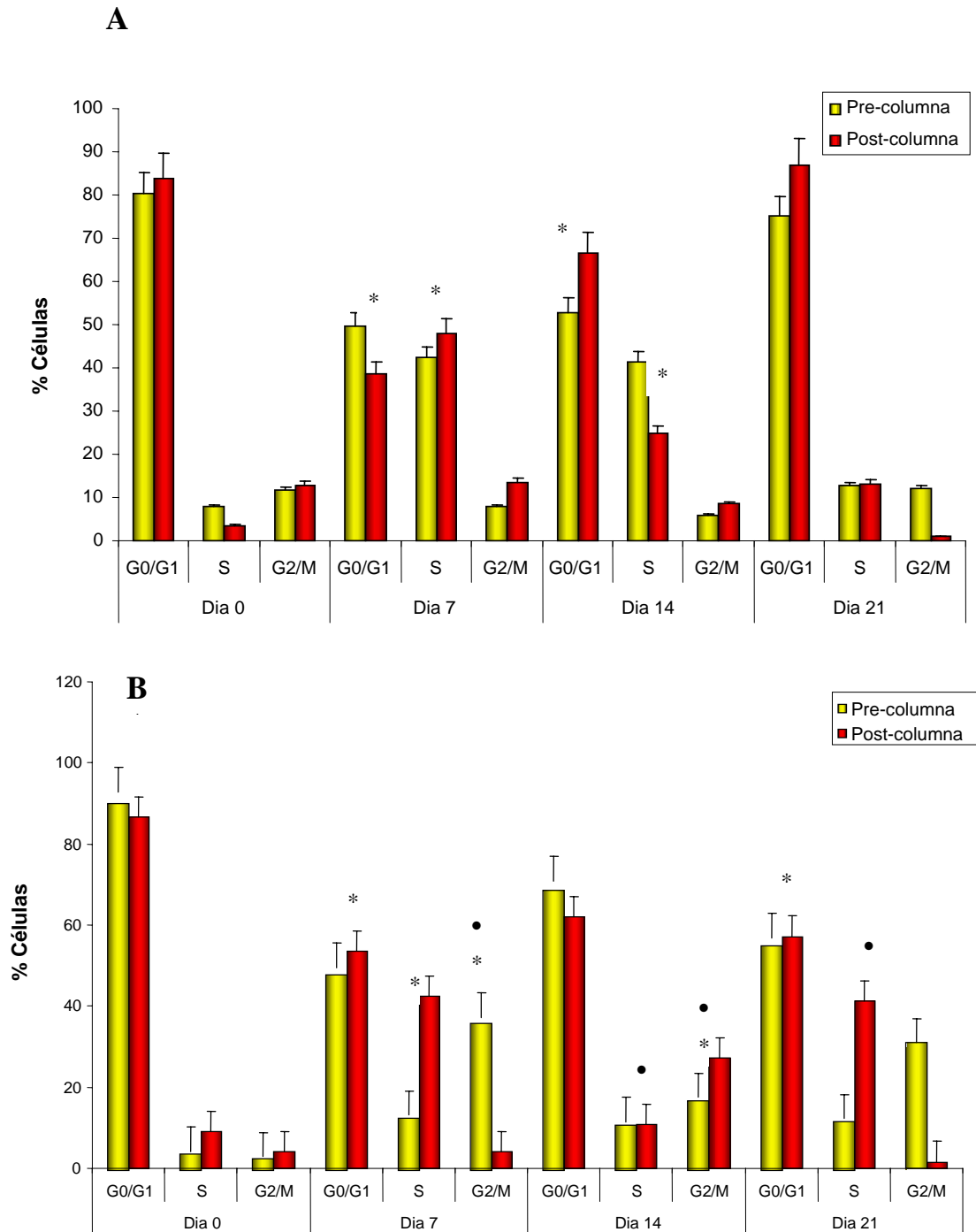
Posteriormente, se analizó el estado del ciclo celular durante el cultivo, como se describió en la **Tabla 4.**, y de esta forma, en la **Fig. 8A**, se observa como después de 7 días de cultivo en presencia de citocinas, las células de SCU, que inicialmente mostraban porcentajes que van del 80 y 83% en las fases G0/G1, antes y después del enriquecimiento la quiescencia se redujo hasta un valor de 50%, y se detectó un incremento similar en la fase de síntesis; mientras que en el caso de la fase G2/M se mantuvo un porcentaje casi idéntico al del día cero. Es interesante recalcar que este comportamiento fue muy parecido al observado en las células que también estuvieron en cultivo por 7 días en presencia de las citocinas, pero que no fueron enriquecidas en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>.

Este patrón de comportamiento también fue muy parecido al observado en las células de SPM (**Fig. 8B**); no obstante, a diferencia de las células de SCU, en SPM existió un mayor porcentaje de células en la fase S post-columna (42%) que precolumna (13%), pero para el caso de la fase G2/M, el porcentaje se detectó alto en las células pre-columna (37%), con respecto a las ya enriquecidas (4%).

| %            | SCU CMN<br>(n=9) | SCU CD34 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup><br>(n=5) | SPM CMN<br>(n=5) | SPM CD34 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup><br>(n=7) |
|--------------|------------------|---|------------------|---|
| <b>G0/G1</b> | 80.5 ± 6.2       | 83.8 ± 7.2                                      | 92.8 ± 3.9       | 86.6 ± 7.1                                      |
| <b>S</b>     | 7.8 ± 4.1        | 3.4 ± 2.1                                       | 4.2 ± 4.3        | * 9.1 ± 3.5                                     |
| <b>G2/M</b>  | 11.7 ± 3.1       | 12.8 ± 3.4                                      | 2.9 ± 3.1        | * 4.3 ± 6.14                                    |

**Tabla 4. Distribución de las CMN y CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> en cada una de las fases del ciclo celular.** Las CMN y CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU así como de SPM, en el día cero (D0) fueron incubadas 15 min con 40 UI/mL de RNasa y posteriormente con 1 µg/mL de Yoduro de Propidio (YP). Se adquirieron 30,000 células en citómetro de flujo. Los datos fueron analizados (se utilizó el software de MultiCycle for Windows) y los resultados son mostrados como el porcentaje de la población en las diferentes fases del ciclo celular en el momento de la colecta. (n= número de muestras). \* Diferencia significativa con respecto a su contraparte en SCU (P<0.05).

Ahora bien, en el día 14, un alto porcentaje de la población de las células de SCU se encontró en la fase G0/G1 pre-columna (52.9%), pero no mayor al observado en SPM (70%), ya que post-columna este porcentaje fue muy similar en ambas fuentes (66.6% y 62% respectivamente); interesantemente en el caso de la fase S, ésta fue mayor en SCU antes y después de la separación (41.3% y 24.8%) y en SPM (11.5% y 10%); pero en la fase G2/M, este porcentaje fue mayor en SPM (17.5% y 27%) que en SCU (5.8% y 8.5%). En el día 21 en las células de SCU, el porcentaje de las células en la fase G0/G1 nuevamente se incrementó, y llegó a superar lo observado en el día cero post-columna (86.9%), ya que en el caso de las células de SPM este porcentaje fue menor (57.2%); no obstante, en estas últimas, la fase S se mostró tres veces por arriba (41%) de lo observado en SCU (13.1%). Finalmente, en ambas fuentes no se detectaron células en la fase G2/M luego del enriquecimiento.



**Fig. 8. Estado del ciclo celular de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>.** Las células de SCU (A) y SPM (B) antes (pre-columna) y después del enriquecimiento (post-columna) de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, fueron cultivadas con citocinas recombinantes (IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3) a diferentes días de cultivo. Las células fueron fijadas, incubadas con 40 UI/mL de RNasa, y teñidas con YP (1µg/mL) por 1 h. Se analizó el porcentaje de las células en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular. Los resultados muestran los promedios de 9 muestras. \* Diferencia significativa con en relación a la misma fuente de día cero (P<0.05). •Diferencia significativa con respecto a su contraparte en SCU (P<0.05).



Respecto a posporcentajes en la fase S, es importante mencionar que al considerar los días 0, 7, 14 y 21 de cultivo, es evidente que existen claras diferencias entre las células de SPM y las de SCU, ya que mientras en las células de SPM se detectó un comportamiento cíclico, en las células de SCU se mostró un marcado incremento en el día 7 que va disminuyendo con respecto al día 14 y 21 de cultivo, lo que podría indicar que los primeros 7 días de cultivo son determinantes en la respuesta y capacidad proliferativa reflejada en los días posteriores.

Para entender un poco más acerca de los eventos intracelulares relacionados con la progresión del ciclo celular en SCU y SPM, y que pudieran estar relacionados con las diferencias observadas en los potenciales de proliferación, se determinó el porcentaje de expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular evaluadas en el día cero.

#### **VI.2.2. Expresión de los reguladores del ciclo celular a día cero.**

En la progresión del ciclo celular, participan un gran número de moléculas, las cuales juegan papeles clave tanto en la inducción de la proliferación, como de la inhibición de ésta, para que se lleven a cabo funciones propias de las células como la maduración y la diferenciación. Sin embargo, algunas de ellas pueden ejercer funciones similares, en donde generalmente la participación de alguna de las moléculas puede sustituir la función de otra y por lo tanto, éstas no necesariamente pueden expresarse de forma simultánea. Por lo que después de haber observado que un alto porcentaje de las CMN, así como de la subpoblación enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, se encontraban en las fases G0/G1 del ciclo celular, se procedió a evaluar la expresión de algunas de las moléculas reguladoras de dicho proceso, las cuales podrían estar participando en la alta quiescencia observada en la **Tabla 4**.

Una fracción de las CMN, así como de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> fue permeabilizada e incubada con anticuerpos monoclonales específicos y conjugados con fluorescencia, para 3 miembros de la familia de

inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI) p16, p21 y p27 y se analizaron 30,000 eventos por citometría de flujo.

Los resultados mostrados en la **Tabla 5.**, indicaron que un alto porcentaje de las células de SPM en la población de CMN expresó la proteína reguladora del ciclo celular p16 con  $95 \pm 4.3\%$  y  $95.1 \pm 5.1\%$  de las células  $CD34^+Lin^-$ ; mientras que para el caso de SCU se obtuvo  $92.6 \pm 7.1\%$  en CMN y  $94 \pm 6.2\%$  de las células  $CD34^+Lin^-$  respectivamente. De igual forma, se detectó que un alto porcentaje de la población de las CMN  $89.6 \pm 3.2\%$  de SPM y SCU  $97.5 \pm 6.3\%$ , así como de las células  $CD34^+Lin^-$   $96.2 \pm 5.4\%$  y  $98 \pm 4.4\%$ , expresaron a la proteína reguladora del ciclo celular p21. No obstante, para el caso de p27, a diferencia de lo antes visto, el porcentaje de expresión fue apenas detectable, con valores que van de  $0.9\%$  en las CMN de SPM, a  $4.4 \pm 1.3\%$  en SCU, mientras que en las células  $CD34^+Lin^-$  los valores oscilaron entre  $1.1\%$  en SCU a  $3.13 \pm 1.2\%$  en SPM. Lo cual sugirió que sólo p16 y p21, participan en la alta quiescencia observada en ambas poblaciones celulares en el momento de la obtención de las muestras.

Aunado a lo anterior, se evaluó la expresión de la ciclina D3, pieza clave en los procesos de la progresión del ciclo celular de la fase G0/G1 a S; y la cinasa dependiente de ciclina tipo 4 (CDK4), la cual puede o no formar complejo con la familia de ciclinas del tipo D, y en conjunto con alguno de los integrantes de la familia de CDKI y continuar con la progresión del ciclo celular. Esto se realizó con la finalidad de demostrar si éste complejo de moléculas participa en los eventos de proliferación observados en éstas células.

En la **Tabla 5**, se muestra que la ciclina D3, se expresó en un alto porcentaje de la población de las células CMN de SPM con  $87.8 \pm 6.1\%$  y de SCU con  $94 \pm 6.7\%$ , al igual que lo observado en las células  $CD34^+Lin^-$  de SPM, con  $96.6 \pm 4.5\%$ ; mientras que para el caso de las células de SCU se expresó en un  $48.3 \pm 8.1\%$ . Este último dato, indicó que en las células de SCU, aproximadamente el 50% de la población expresó la ciclina D3, lo que sugirió que el otro 50% podría utilizar alguna otra de las ciclinas para iniciar con la progresión del ciclo celular y como consiguiente la proliferación de éstas, o bien, que son

valores suficientes para desencadenar una respuesta en la proliferación. Expresión similar a la observada para la CDK4, con niveles bajos en los porcentajes detectados en las células MNC de SPM  $4.89 \pm 3.1\%$ , SCU  $1.27\%$  y células  $CD34^+Lin^-$   $7.34 \pm 2.2\%$  y  $8.06 \pm 3.5\%$  respectivamente. Porcentajes que podrían estar indicando la expresión de niveles basales o bien, que esta molécula no tiene una participación importante en éstas células.

| %                     | SCU<br>CMN<br>(n=6) | SCU<br>CD34 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup><br>(n=6) | SPM<br>CMN<br>(n=6) | SPM<br>CD34 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup><br>(n=6) |
|-----------------------|---------------------|--|---------------------|--|
| <b>p16</b>            | 92.6<br>± 7.1       | 94<br>± 6.2  | 95.5<br>± 4.3       | 95.1<br>± 5.1                                      |
| <b>p21</b>            | 97.5<br>± 6.3       | 98<br>± 4.4  | 89.6<br>± 3.2       | 96.2<br>± 5.1                                      |
| <b>p27</b>            | 4.4<br>± 1.3        | 1.1<br>± 0.5                                       | 0.9<br>± 0.4        | 3.13<br>± 1.2                                      |
| <b>Ciclina<br/>D3</b> | 94<br>± 6.7         | 48.3<br>± 8.1                                      | 87.8<br>± 6.1       | * 96.6<br>± 4.5                                    |
| <b>CDK4</b>           | 1.27<br>± 0.2       | 8.06<br>± 3.5                                      | 4.89<br>± 3.1       | 7.34<br>± 2.2                                      |

**Tabla 5. Porcentaje de células positivas a los reguladores del ciclo celular.** Las CMN y  $CD34^+Lin^-$  de SCU así como de SPM, en el día cero (D0) fueron permeabilizadas e incubadas con anticuerpos específicos, conjugados con fluorocromos contra las proteínas: p16, p21, p27, Ciclina D3 y CDK4. Se adquirieron 30,000 células en citómetro de flujo, y en la tabla se muestran los resultados en porcentaje de expresión. (n= número de muestras). \*Diferencia significativa con respecto a su contraparte de SCU (P<0.05).

Al igual que con el antígeno CD34, descrito anteriormente, se decidió analizar la IFM. De esta manera, en la **Tabla 6.**, se observó que para el caso de p16, las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM emitieron una mayor fluorescencia por célula ( $32.8 \pm 4.5$ ), que las de SCU ( $4.3 \pm 2.1$ ). En lo que respecta a p21, se detectó una mayor IFM por célula en las CMN de SPM con  $81 \pm 8.1$ ; mientras que en las CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> fue de  $33 \pm 5.1$ , y en SCU de  $36 \pm 7.2$  y  $42 \pm 1.3$  respectivamente. Para p27 se observó la misma tendencia que la detectada en p16, en donde en la población de células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM, la IFM de  $51 \pm 4.2$ , fue mayor que la de las células de SCU tanto en las CMN  $2.4 \pm 1.1$ , así como las CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>  $2.8 \pm 1.3$ . Esto nos podría indicar que la alta quiescencia (fase G0/G1) detectada con IP en el momento de la colecta, es debida, a que un alto porcentaje de la población, expresa la proteína CDKI p21, importante en los procesos de inhibición de la proliferación.

Sin embargo, es interesante resaltar que a pesar del alto porcentaje detectado de p16 en SPM así como SCU, en las dos poblaciones (CMN y CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>), al hablar de la IFM, sólo en la población CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM parece llevar a cabo una participación importante en la quiescencia; al igual que sucede con p27, en donde a pesar de que una parte de la población la expresó un  $3.13 \pm 1.2\%$ , las pocas células que la presentaron, emitieron una alta IFM ( $51 \pm 4.2$ ).

En lo que respecta a la Ciclina D3, en la **Tabla 6.**, se observó una IFM de  $40 \pm 2.1$  en las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM, mientras que para las de SCU en la misma población, la IFM fue de  $5.1 \pm 6$ . Si esto se compara con el porcentaje de expresión de la **Tabla 5.**, nos podría indicar que la Ciclina D3 tiene una mayor participación en la progresión del ciclo celular en SPM a diferencia de las de SCU, o bien, que en ésta última sus niveles de expresión o son basales o no se requiere muchas moléculas (Ciclina D3) para llevar a cabo la progresión del ciclo celular.

| <b>IFM</b>            | <b>SCU<br/>CMN<br/>(n=6)</b> | <b>SCU<br/>CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup><br/>(n=6)</b> | <b>SPM<br/>CMN<br/>(n=6)</b> | <b>SPM<br/>CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup><br/>(n=6)</b> |
|-----------------------|------------------------------|--|------------------------------|--|
| <b>p16</b>            | 2.8<br>± 1.2                 | 4.3<br>± 2.1   | * 8.5<br>± 1.5               | * 32.8<br>± 4.5  |
| <b>p21</b>            | 36<br>± 7.2                  | 42<br>± 1.3  | * 81<br>± 8.1                | 33<br>± 5.1  |
| <b>p27</b>            | 2.4<br>± 1.1                 | 2.8<br>± 1.3   | 7.7<br>± 1.9                 | * 51<br>± 4.2  |
| <b>Ciclina<br/>D3</b> | 22.2<br>± 2.1                | 5.1<br>± 1.6   | * 4<br>± 1.1                 | * 40<br>± 2.1  |
| <b>CDK4</b>           | 11<br>± 1.4                  | 13<br>± 2.1  | * 1<br>± 1.4                 | * 2.1<br>± 1.1   |

**Tabla 6. Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) emitida por los reguladores del ciclo celular.** Las CMN y CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU así como de SPM, en día cero (D0) fueron permeabilizadas, incubadas con anticuerpos específicos y conjugados con fluorocromos contra las proteínas: p16, p21, p27, Ciclina D3 y CDK4. Se adquirieron 30,000 células en citómetro de flujo. Los resultados se muestran como el promedio de la IFM emitida por las células en unidades arbitrarias. (n= número de muestras). \* Diferencia significativa en relación a su contraparte en SCU (P<0.05).

Finalmente en lo que se refiere a la CDK4, el porcentaje de expresión fue muy bajo en los dos modelos de estudio, con porcentajes que no superan el 10% de la población de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> sin alguna diferencia significativa. Para el caso de la IFM, ésta también fue baja; sin embargo, en SCU la fluorescencia emitida ( $13 \pm 2.1$ ) es 6 veces mayor a la IFM emitida por la SPM ( $2.1 \pm 1.1$ ).

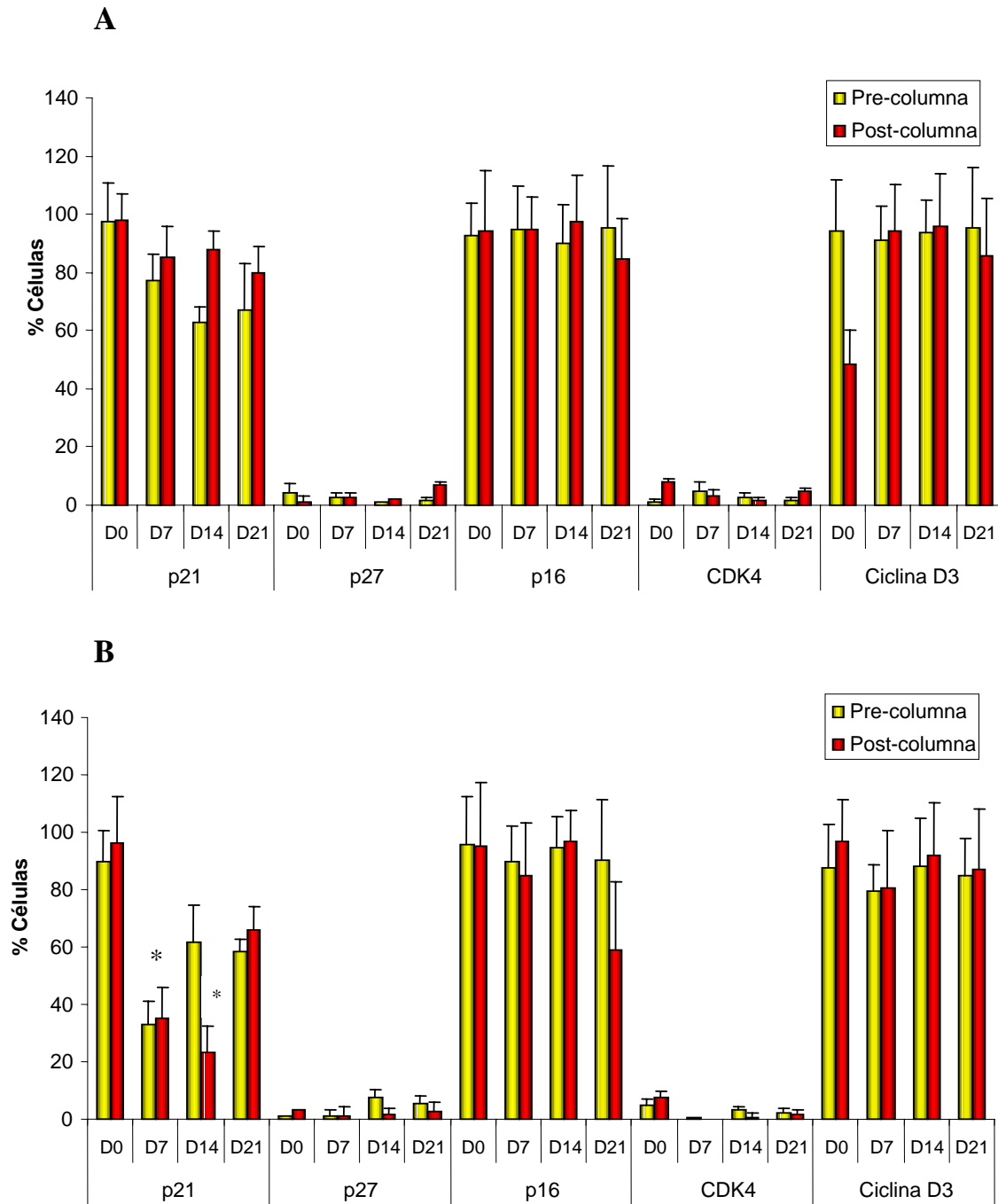
### **VI.2.3. Expresión de los reguladores del ciclo celular durante el cultivo (Día 7, 14 y 21).**

Siguiendo con el patrón de expresión de los reguladores del ciclo celular, se evaluó su presencia a los diferentes días del cultivo. En la **Fig. 9A**, se observa, que en el día cero, pre y post-columna, el 98% de la población celular de SCU expresó la proteína p21 (como antes se mostró); post-columna, este nivel de expresión disminuyó ligeramente al día 7 con 85%, 14 con un 88% y 21 de cultivo con 79.9%; puesto que pre-columna, aunque la población celular tuvo una expresión similar después del enriquecimiento, éste nivel de expresión se detectó por debajo en el día 7 con 77%, día 14 con 63% y día 21 con 67% de cultivo. Para el caso de la proteína p27, se observó un porcentaje de expresión muy bajo, y éste fue de 1.1% en el día 7, 2.2% en el día 14 y 6.8% en el día 21 de cultivo.

Sin embargo a diferencia de p27, para el caso de p16, prácticamente toda la población la expresó, y este nivel de expresión se mantuvo desde el día cero y hasta el día 21 de cultivo sin diferencias significativas entre la población pre y post-columna. Mientras que en el caso de CDK4, al igual que para p27, el porcentaje de expresión fue apenas detectable y estos niveles de expresión se mantuvieron desde el día cero y hasta el día 21 de cultivo. Finalmente, casi el 100% de la población expresó la ciclina D3, similar a lo observado en p16 y p21, no obstante, en el día cero ésta proteína se detectó sólo en un 50% de la población. En el caso de la SPM, en la **Fig. 9B**, se encontró que el porcentaje de expresión de las proteínas p16, p27, CDK4 y la Ciclina D3, fue muy parecido al observado en SCU, aunque este porcentaje se detectó relativamente por debajo, y sin diferencias significativas entre ambos modelos de estudio pre-columna y post-columna. Particularmente, en p21, si se detectaron diferencias en cuanto al porcentaje de expresión, ya que en el día 7 de cultivo, la población celular disminuyó su expresión a casi un 40%, mientras que en SCU fue más del 80%; ya en el día 14, su expresión fue en promedio del 25% y en SCU se mostró por arriba del 80%. Finalmente, en el día 21, el porcentaje se incrementó a más del 60% en SPM, y en SCU éste fue del 80%. Estos resultados observados, tanto en SPM así como en SCU sugieren que las moléculas p27 y CDK4 no tendrían una

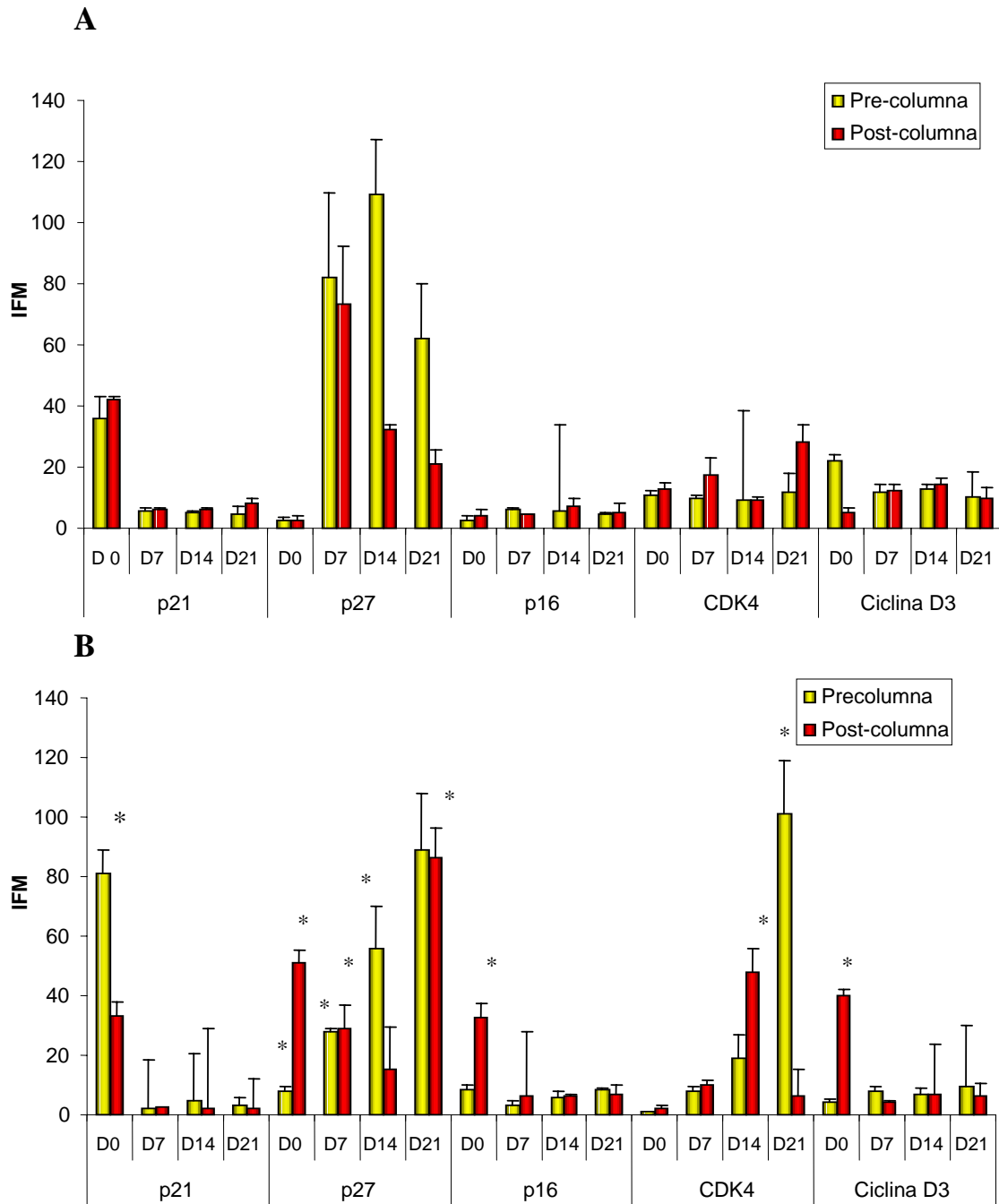
participación importante en los procesos de regulación del ciclo celular o bien, que los niveles de expresión son basales, mientras que en el caso de p16 y la Ciclina D3, los valores podrían indicar una participación constante en los diferentes días de cultivo.

No obstante lo anterior, se determinó la IFM emitida por las células, como se hizo en el día cero de cultivo, interesantemente se encontró tanto en SCU **Fig. 10A**, así como en SPM **Fig. 10B**, que aquellas poblaciones enriquecidas y no enriquecidas en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, que expresaron altos porcentajes de las proteínas p16, p21 y ciclina D3, ahora presentaron una IFM (graficado en unidades arbitrarias) baja, misma que se mantuvo hasta el día 21, pre-columna y post-columna. Particularmente, contrario a lo antes observado, en SPM para el caso de p27, aquí sí se detectaron diferencias significativas: post-columna, en donde el porcentaje de expresión a día cero fue del 3%, la IFM fue de 51, en el día 7 el porcentaje fue 1% y la IFM de 28.9, a día 14 con porcentaje del 2% y una IFM de 15.5, finalmente a día 21 con porcentaje del 2% y una IFM de 86.1. Para el caso de p16 y ciclina D3, a día cero y CDK4 a día 14 post-columna, también se encontraron diferencias significativas con respecto a las otras moléculas en los diferentes días de cultivo.



**Fig. 9. Expresión de reguladores del ciclo celular en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>.** Las células de SCU (A) y SPM (B) antes (pre-columna) y después del enriquecimiento (post-columna) de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> fueron cultivadas con citocinas recombinantes (IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3). En el día cero (D0), D7, D14, y D21, las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos específicos, conjugados con fluorocromos contra las proteínas: p16, p21, p27, Ciclina D3 y CDK4. Se adquirieron 30,000 células en citómetro de flujo, y la figura representa el promedio de 6 muestras en porcentaje de expresión. \*Diferencia significativa con respecto a su contraparte en SCU (P<0.05).



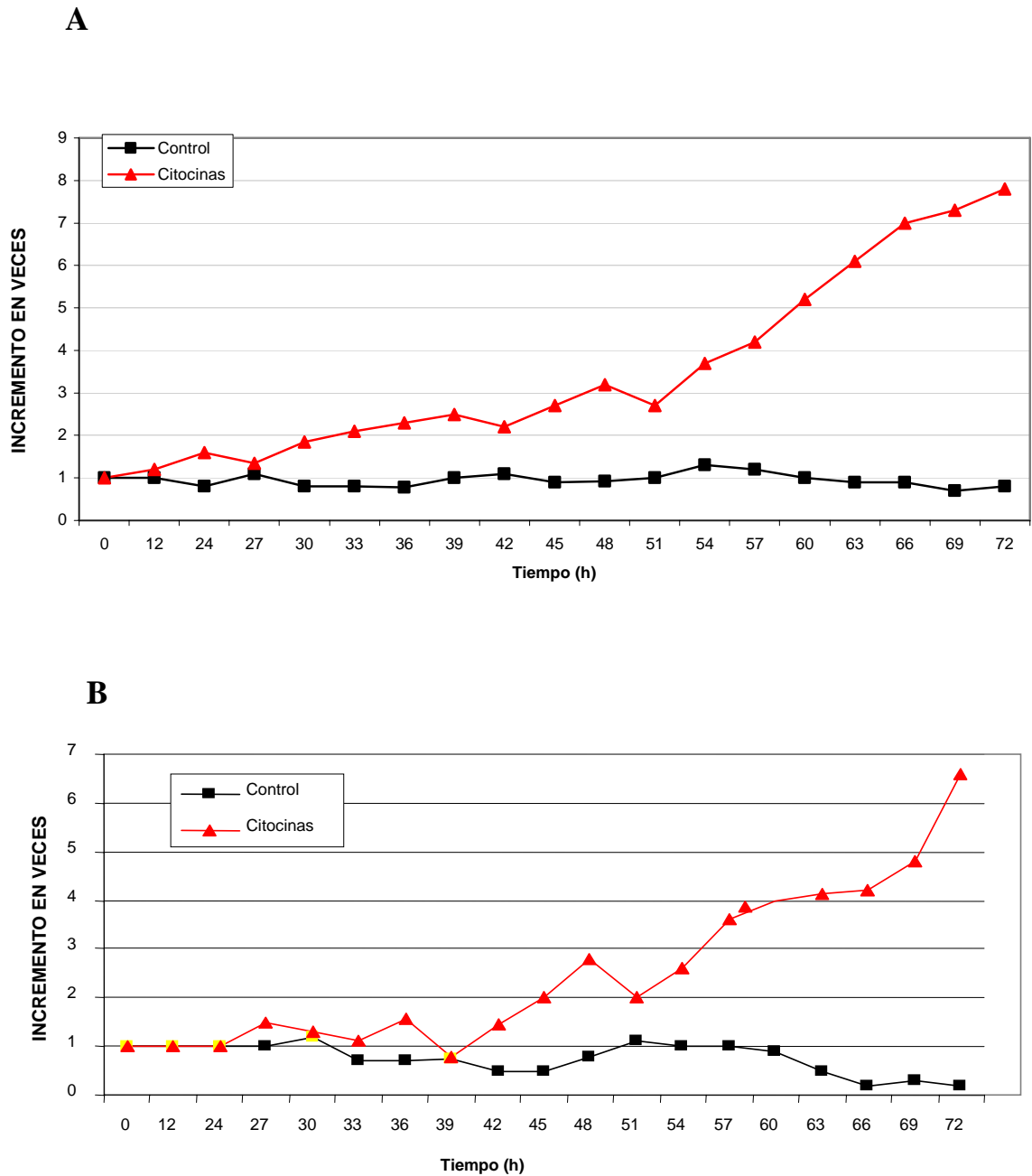


**Fig. 10. Fluorescencia media emitida por los reguladores del ciclo celular en células  $CD34^+Lin^-$ .** Las células de SCU (A) y SPM (B) antes (pre-columna) y después del enriquecimiento (post-columna) de las células  $CD34^+Lin^-$ , fueron cultivadas con citocinas recombinantes (IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3). En el día cero (D0), D7, D14, y D21, las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos específicos, conjugados con fluorocromos contra las proteínas: p16, p21, p27, Ciclina D3 y CDK4. Se adquirieron 30,000 células en citómetro de flujo, y la figura representa el promedio de 6 muestras en Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) en unidades arbitrarias. \*Diferencia significativa con respecto a su contraparte de SCU ( $P < 0.05$ ).

En SCU, al igual que en SPM, sólo en p27 se detectaron variaciones a partir del día 7 post-columna con una IFM de 73.3, día 14 con 32.2 y día 21 con 20.9 de IFM. En el caso de la CDK4, sólo se detectó una IFM considerable a día 21 post-columna, a diferencia de lo observado en SPM pre-columna, con una IFM de 100. Estos resultados sugieren que a pesar de que casi el 100% de la población expresa las proteínas p16, p21 y la ciclina D3, no todas las células las expresan con la misma intensidad de fluorescencia, lo que significa una expresión diferencial del número de moléculas por célula.

#### **VI.2.4. *Tiempo de doblaje y tránsito del ciclo celular a siete días de cultivo.***

El hablar de ciclo celular implica analizar eventos que se presentan a lo largo del cultivo, que pueden ser evaluados en diferentes intervalos de tiempo y los resultados obtenidos hasta este momento se evaluaron cada 7 días, lo que podría considerarse como tiempo largo, ésto de acuerdo al análisis de la progresión del ciclo celular; se decidió estudiar los parámetros antes mencionados durante las primeras hrs de cultivo, para que de esta manera se pudieran observar algunas diferencias que posiblemente no son detectadas cada 7 días de cultivo y que incluso podrían perderse al día 21. Un evento importante en términos de la progresión del ciclo celular es el tiempo de duplicación celular y para estudiarlo, 100, 000 células de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> tanto en SPM así como de SCU, fueron cultivadas en medio de expansión libre de suero en presencia (Citocinas) y ausencia de factores de crecimiento (Control) y cada 3 h se cosecharon las células hasta 72 h, los núcleos celulares fueron liberados con diluyente de Turk y contados un hemocitómetro.

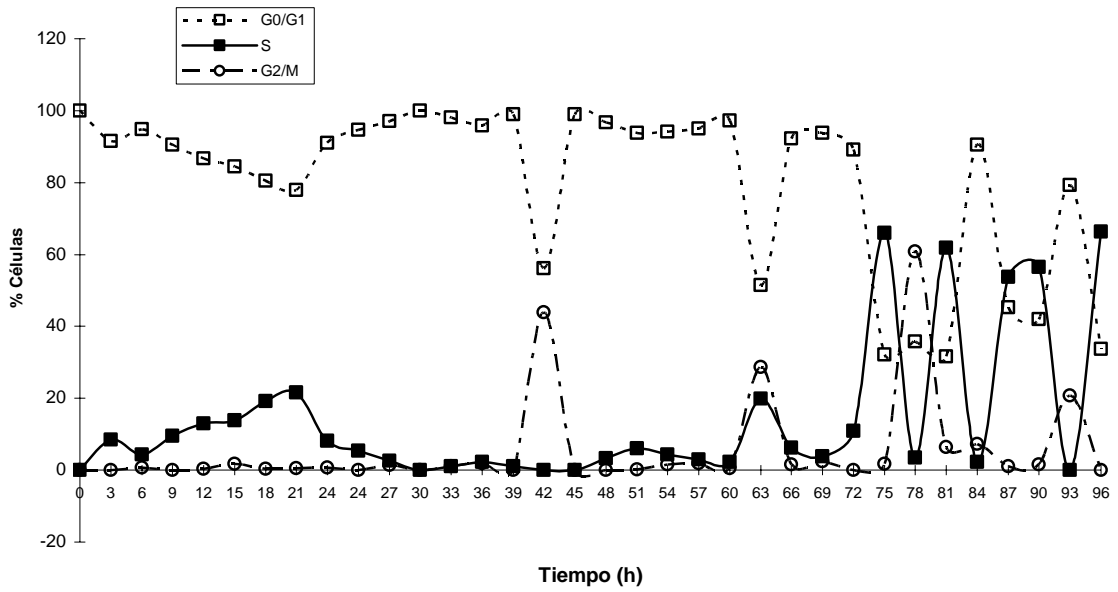
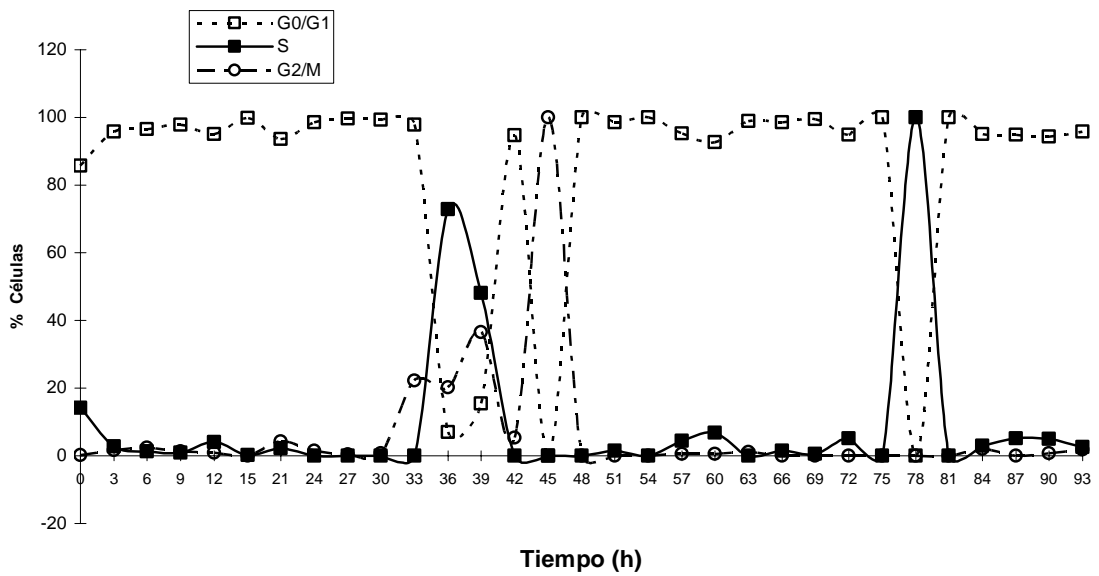


**Fig. 11. Tiempo de doblaje en las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>.** 100, 000 células de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU (A) y SPM (B) fueron cultivadas en medio de expansión libre de suero, en presencia (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3 y ausencia de citocinas (Control), y cada 3 h se cosecharon las células hasta 72 h, los núcleos celulares fueron liberados con diluyente de Turk y contados en un hemocitómetro. El tiempo de doblaje se obtuvo graficando el número células en el tiempo cero (que se consideraron como 1) hasta 72 h de cultivo. Tanto para SCU como para SPM existe diferencia significativa (P<0.05) desde las 45 h de cultivo y hasta el final del mismo.

En la **Fig. 11A**, se puede observar que el primer tiempo de duplicación para las células de SCU fue a aproximadamente a las 33 h, el segundo a las 56-57 h, y el tercero se detectó aproximadamente a las 75 h de cultivo. Mientras que para las células de SPM (**Fig. 11B**), el primer tiempo de duplicación se detectó a las 45 h y el segundo a las 60 h. Este resultado, de entrada representa un primer parámetro a corto tiempo, de la capacidad proliferativa de las células de la SCU.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, se decidió determinar el tránsito del ciclo celular, y evidenciar el tiempo que dura cada una de las fases (G0/G1, S y G2/M) y correlacionarlo con el tiempo de duplicación de la población celular y de esta manera determinar otro parámetro a considerar en la proliferación de la SCU y la SPM durante las primeras 168 h de cultivo. Por lo que primeramente se evaluó la progresión del ciclo celular de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, y las células fueron sembradas en las mismas condiciones arriba mencionadas (en ausencia y presencia de factores de crecimiento) cada 3 h se cosecharon las células y se incubaron con IP como se describió en materiales y métodos.

Las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU (**Fig. 12A**), así como las de SPM (**Fig 12B**), en ausencia de factores de crecimiento, no transitaron en el ciclo celular y se mantuvieron quiescentes. No obstante, en el caso de SCU, entre las 39 y 45 h disminuyó la fase G0/G1 a casi un 50% y la mitosis se incrementó a un porcentaje de casi un 50% sin aumento de síntesis. Luego de 72 h de cultivo se volvió a observar una disminución de la fase G0/G1 y picos de expresión que superan el 50% tanto de la fase S así como de la G2/M, hasta las 96 h considerado como el término del ensayo.

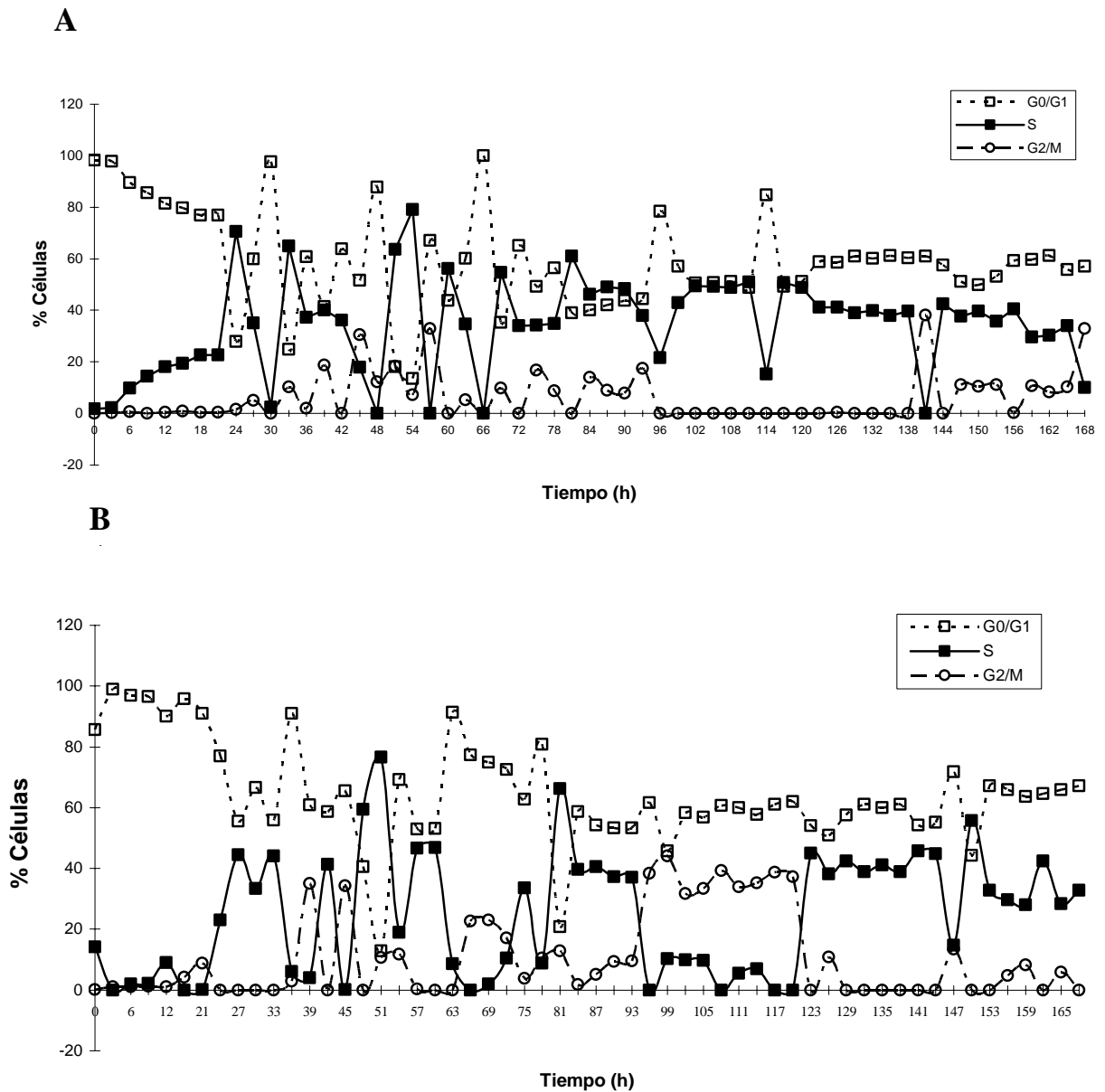
**A****B**

**Fig. 12. Progresión del ciclo celular en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> en ausencia de citocinas.** Células de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU (A) y SPM (B) fue cultivada en medio de expansión libre de suero en ausencia de citocinas y cada 3 h se cosecharon las células hasta 96 h, las cuales fueron incubadas con YP como se describió en materiales y métodos.

En el caso de las células de SPM, se detectó un evento similar al observado en la SCU luego de 72 h y en este caso desde las 33 h de cultivo, en donde se vió una disminución de la fase G0/G1 y un incremento en la fase S y G2/M, y a las 78 h nuevamente se observó un incremento en la fase S y no así para la fase G2/M; luego de este tiempo, se mantuvo la quiescencia hasta 96 h, equivalente a 4 días de cultivo, tiempo hasta el que se siguió el análisis del experimento. Es interesante mencionar que a pesar de lo observado anteriormente, en cuanto al número celular, no se encontró una duplicación de las células en los dos modelos de estudio. En el caso de SCU, las células en ese día, mantuvieron las características morfológicas propias de las células troncales hematopoyéticas.

Por otra parte, las células de SCU que fueron cultivadas en presencia de las citocinas (**Fig. 13A**), mostraron progresión del ciclo celular desde el inicio del cultivo, ya que desde las 6 h, la fase G0/G1 disminuye, y continúa así hasta las 24 h con un 28% de la población, así mismo, se incrementa la fase S hasta un 70%; sin embargo, el porcentaje de las células en la fase G2/M, se mantiene en 1.5% de la población. Es importante remarcar que los ciclos que se van generando durante el tiempo de cultivo, se traslapan y por lo tanto no se definen fácilmente, ésto es debido probablemente a los diferentes estados de maduración de las células y su capacidad de respuesta a las citocinas.

En la **Tabla 7**, se puede observar que el primer ciclo en la SCU dura aproximadamente entre 30 y 36 h; asimismo, se detectan entre 7 y 9 ciclos; mientras que en el caso de la SPM el primer ciclo se detecta aproximadamente a las 42 h, y entre 5 y 7 ciclos durante los primeros 7 días. Posterior al primer ciclo celular, se pudieron determinar una serie de ciclos relativamente más cortos con respecto al primero de entre 15 y 21 hrs, esto de acuerdo a la progresión secuencial de las células en las fases G0/G1, S, y G2/M aproximadamente hasta 120 h.



**Fig. 13. Tránsito del ciclo celular en células  $CD34^+Lin^-$  en presencia de citocinas.** Células de la población enriquecida en células  $CD34^+Lin^-$  de SCU (A) y SPM (B), fueron cultivadas en medio de expansión libre de suero en presencia de citocinas IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3 y cada 3 h se cosecharon las células hasta 168 h equivalente a 7 días de cultivo, las cuales fueron incubadas con YP como se describió en materiales y métodos. Existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en todos los puntos, con sus respectivos controles cultivados en ausencia de citocinas (Fig. 12).

Para el caso de las células de SPM (**Fig. 13B**), se observó un comportamiento muy similar a SCU Sin embargo, la primera disminución de la fase G0/G1 ocurrió luego de 24 h de cultivo, un incremento en la fase S desde las 24 h y la fase G2/M a las 39 h, para completar finalmente un ciclo celular aproximadamente a las 42 h; interesantemente, este tiempo también correlacionó con el observado en el tiempo de duplicación mostrado en el ensayo anterior (**Fig. 11B**) y como en las células de SCU, se observó un traslape en los ciclos celulares. Estos eventos de la progresión del ciclo celular durante los primeros 4 días de cultivo (96 h) fueron muy marcados en ambos modelos de estudio.

No obstante, luego de este tiempo, aproximadamente el 50% de la población de las células de SPM entró en una etapa de largos períodos de quiescencia, en la cual ya no se pudo definir el tiempo de duración de cada ciclo celular; mientras que en SCU, esto se detectó luego de 5 días de cultivo (120 h). De esta manera se pudo ver que el primer ciclo considerado como corto y el mayor número de ciclos se presentó en las células de SCU, mientras que en la SPM el primero fue relativamente largo y el número de ciclos fue menor, lo cual puede indicar que estos eventos dependen del origen del cual provienen las células.



| SCU    |            |              |                              | SPM    |            |              |                             |
|--------|------------|--------------|------------------------------|--------|------------|--------------|-----------------------------|
| Ciclos | Tiempo (h) | Duración (h) | Fases (h)                    | Ciclos | Tiempo (h) | Duración (h) | Fases (h)                   |
| 1º     | 0-36       | 36           | G0/G1 24<br>S 9<br>G2/M 6    | 1º     | 0-42       | 42           | G0/G1 33<br>S 9<br>G2/M 6   |
| 2º     | 24-42      | 18           | G0/G1 9<br>S 6<br>G2/M 6     | 2º     | 33-48      | 15           | G0/G1 6<br>S 6<br>G2/M 6    |
| 3º     | 33-48      | 15           | G0/G1 12<br>S 12<br>G2/M 6   | 3º     | 42-57      | 15           | G0/G1 9<br>S 9<br>G2/M 9    |
| 4º     | 45-60      | 15           | G0/G1 6<br>S 9<br>G2/M 6     | 4º     | 51-75      | 24           | G0/G1 9<br>S 6<br>G2/M 12   |
| 5º     | 54-72      | 18           | G0/G1 6<br>S 9<br>G2/M 6     | 5º     | 60-84      | 24           | G0/G1 6<br>S 9<br>G2/M 9    |
| 6º     | 60-81      | 21           | G0/G1 9<br>S 6<br>G2/M 9     | 6º     | 75-96      | 18           | G0/G1 6<br>S 6<br>G2/M 9    |
| 7º     | 69-87      | 18           | G0/G1 6<br>S 6<br>G2/M 6     | 7º     | 81-102     | 21           | G0/G1 6<br>S N.D.<br>G2/M 9 |
| 8º     | 75-97      | 21           | G0/G1 6<br>S 12<br>G2/M 6    | 8º     | N.D.       | N.D.         | N.D.                        |
| 9º     | 93-114     | 21           | G0/G1 9<br>S 18<br>G2/M N.D. | 9º     | N.D.       | N.D.         | N.D.                        |
| 10º    | 111-144    | 33           | G0/G1 6<br>S 9<br>G2/M 6     | 10º    | N.D.       | N.D.         | N.D.                        |
| 11º    | N.D.       | N.D.         | N.D.                         | 11º    | N.D.       | N.D.         | N.D.                        |

Tabla 7. Número de ciclos celulares y fases detectadas durante los primeros 7 días de cultivo, en la población enriquecida en células de SCU y SPM con YP. N.D.=No Detectado.

### **VI.2.5. Expresión de reguladores de ciclo celular a tiempos cortos.**

Finalmente, se evaluó el nivel de expresión de las moléculas reguladoras analizadas anteriormente, esto con el objeto de ver si alguna de ellas estaba directamente relacionada con los resultados obtenidos, y de esta manera evidenciar eventos moleculares clave, relacionados con la progresión del ciclo celular, que pudieran marcar la diferencia entre las células de SCU y SPM. Para lo cual, la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU y SPM, fue sembrada en ausencia y presencia de las citocinas de acción temprana, intermedia y tardía, la cosecha celular se realizó cada 3 h y hasta 168 h (7 días de cultivo). Las células fueron incubadas en presencia de anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas p16, p21, p27, Ciclina D3 y CDK4 conjugados con fluorescencia. Se adquirieron 30,000 eventos, y se analizaron mediante citómetro de flujo.

Como se muestra en la SCU (**Fig. 14A**), y de acuerdo a la IFM, en presencia y ausencia de citocinas, durante las primeras 24 hrs, la Ciclina D3 fue altamente expresada, ya que posteriormente presentó una marcada disminución. Un punto importante por mencionar, es la posible correlación que pudiera tener ésta molécula con la progresión del ciclo celular (**Fig. 13A**) en la primera disminución de la fase G0/G1 y el punto máximo de la fase S del primer ciclo celular.

Asimismo se pudo ver que en este tiempo se inició un segundo ciclo celular. Posteriormente, a las 48 hr se volvió a incrementar el nivel de expresión, para luego disminuir y mantenerse constante, aunque la IFM disminuyó con respecto a las primeras 20 h del cultivo, con ligeros incrementos durante el todo el ensayo hasta las 196 h. Sin embargo, al graficar el porcentaje de expresión (**Fig. 14B**) de la ciclina en toda la población a lo largo del cultivo, se pudieron observar niveles de expresión de forma cíclica, ya que durante las primeras tres horas de cultivo, la población incrementó su expresión a más del 95%, la cual se mantuvo constante hasta 24 h, (tiempo que correlaciona con el tiempo en el que las células empezaron a ciclar por la disminución de la fase G0/G1 y el incremento de la fase S) luego de este tiempo se redujo en promedio a un 50%, se mantuvo con ligeras variaciones por aproximadamente 20 h. Pasando este tiempo, llegó a un punto de

expresión apenas detectable con porcentajes del 2% en promedio por 24 h, que fueron de 48 a 72 h, posterior a ésta, la población volvió a incrementar su expresión y mantenerla en un promedio del 60 al 70% por un período de 24 h que van de 72 a 96 h, y en éste último tiempo, volvió a llegar a un nivel de expresión bajo, pero que sin embargo no fue igual al porcentaje observado a las 48 h, pero si mantuvo un tiempo de expresión constante de 24 h; a 120 h se incrementó y llegó a un punto de expresión del 50% en promedio, con ligeras variaciones por más de 40 h para llegar a 162 h y finalmente pasando éste punto, la expresión se incremento a un porcentaje mayor al observado entre las 72 y 96 h.

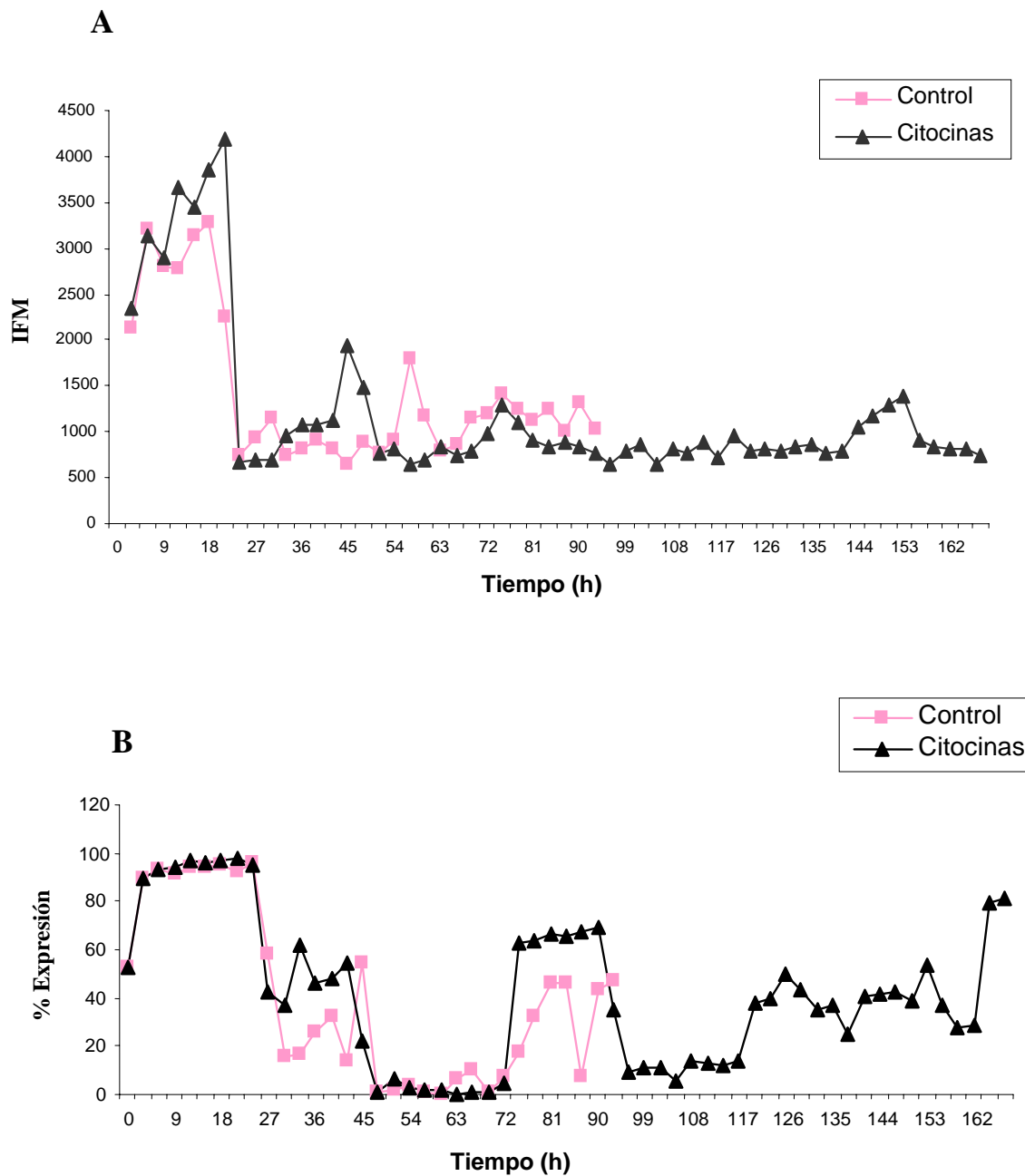
En lo que respecta al control, se pudo observar que al parecer no existe diferencia en la expresión en las células en presencia de citocinas, no obstante, este evento no se vió reflejado en el tiempo de doblaje analizado en la **Fig. 11A**. Es interesante mencionar, que en la progresión del ciclo celular a partir de las 102 h la fase S se mantuvo constante, y que en este tiempo ya es difícil detectar el inicio y término de un ciclo celular.

En el caso de la SPM (**Fig. 15A**), Ciclina D3 fué apenas detectable en la IFM con respecto a la SCU; sin embargo, en el control si existieron variaciones muy marcadas, que incluso llegaron a ser mayores que las vistas en SCU en presencia y ausencia de citocinas. Este comportamiento podría indicar que la ciclina D3 en SPM no es necesaria en la progresión del ciclo celular; y en el caso del control, la fluorescencia emitida pudiera ser el resultado de la falta de citocinas y que la célula pierda el control de sus funciones.

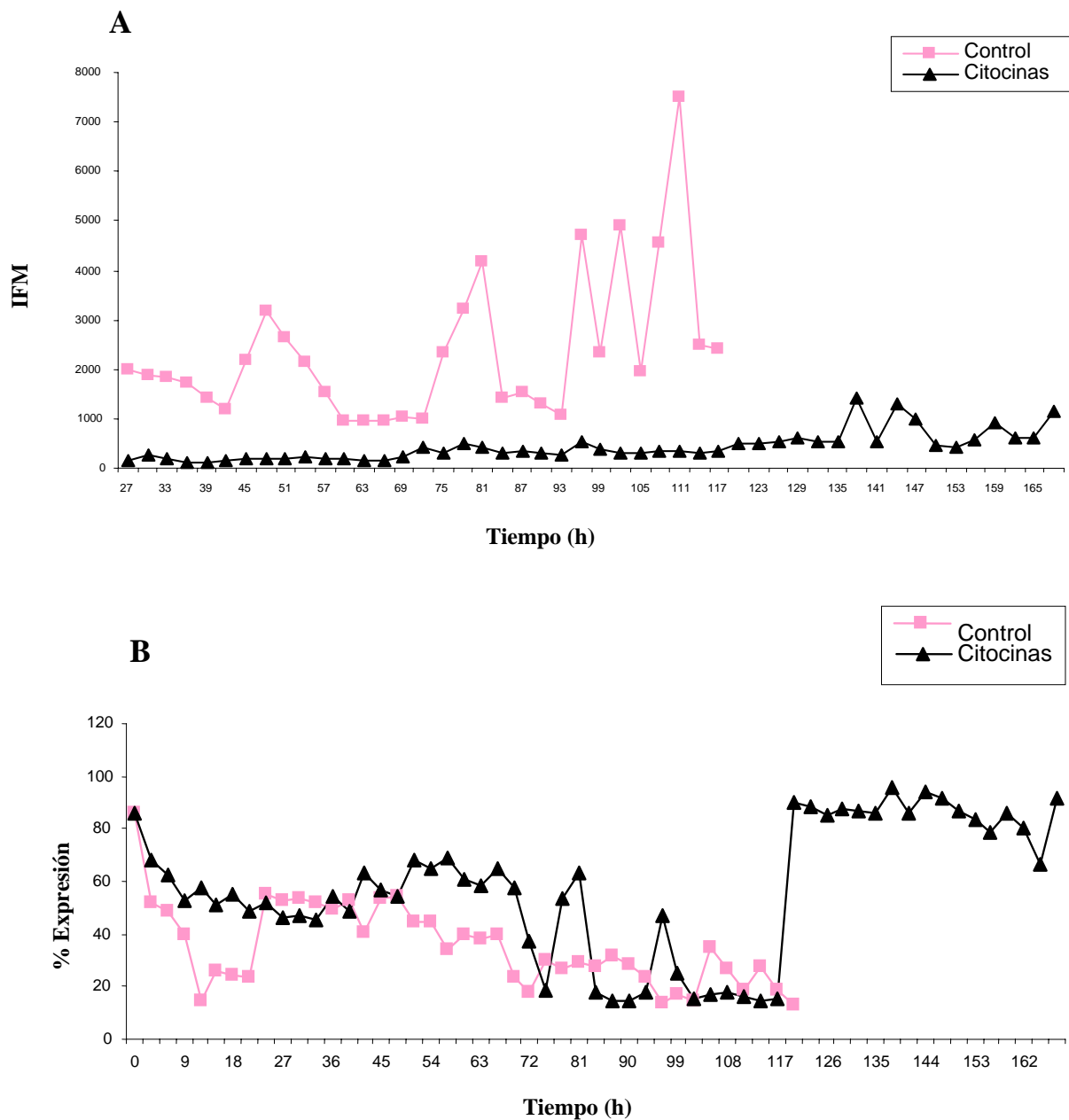
Al evaluar el porcentaje de expresión de la población (**Fig. 15B**), se pudo ver que éste disminuyó desde las primeras 9 h del cultivo y se mantuvo constante en un 50-60% por aproximadamente 70 h, ya que luego de 72 h y por casi 40 h, se presentaron variaciones en el porcentaje de expresión que llegó a un 15% entre las 100 y 117 h, puesto que a 120 h y hasta 168 h la población celular incrementó su expresión a un 90% y éste porcentaje se mantuvo constante hasta el final del cultivo. Lo anterior sugiere que a pesar de una baja expresión de moléculas de la ciclina D3 por célula, un porcentaje considerable de la población celular la expresa.

En las células de SCU en lo que se refiere a la proteína CDK4, en la **Fig. 16A**, se pudo observar que se presentaron variaciones en la IFM emitida por las células en ambas condiciones de cultivo, sin embargo, en presencia de citocinas estas variaciones iniciaron luego de 36 h y se mantuvieron hasta 72 h mientras que en la condición control, este comportamiento se presentó después de 48 h, y continuó hasta las 81 h y posterior a esto se mantuvo con una expresión constante. Finalmente, en presencia de citocinas, aproximadamente a 96 h y a 150 h se repitieron los picos de alta expresión. Por su parte, al evaluar el porcentaje (**Fig. 16B**), se detectó que a partir de las primeras 3 h del cultivo, la población aumentó su expresión arriba del 40%, pero a 27 h prácticamente toda la población redujo su expresión a niveles apenas detectables durante más de 90 h, y a 138 h se repitió nuevamente el incremento en la expresión por casi 15 h con un pico máximo del 55% a las 144 h.

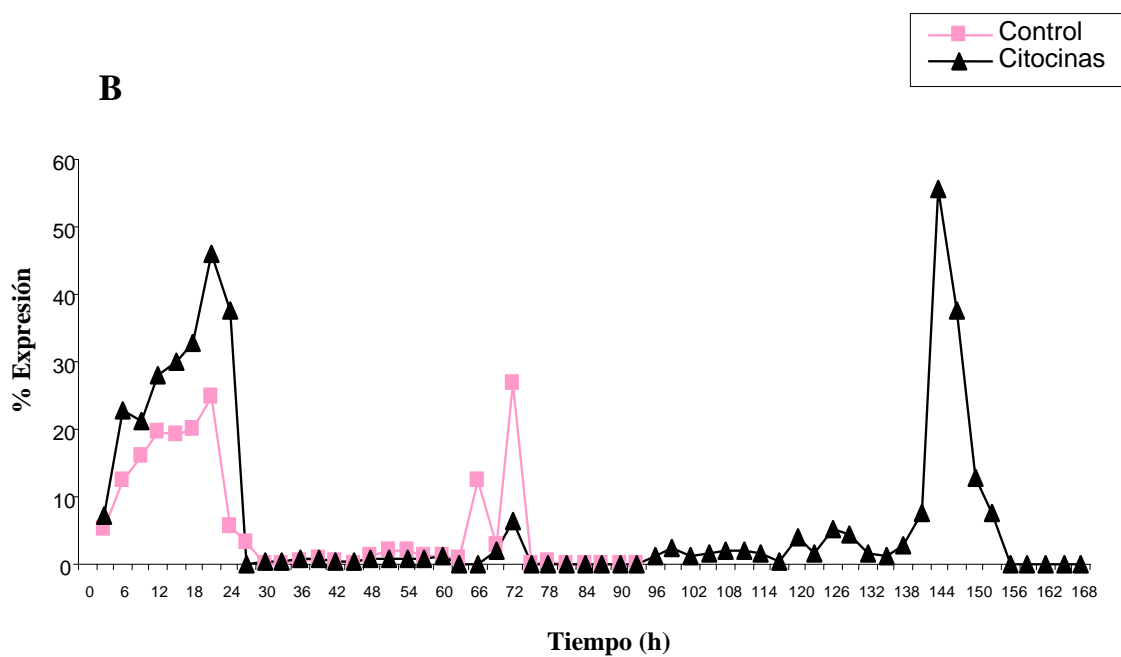
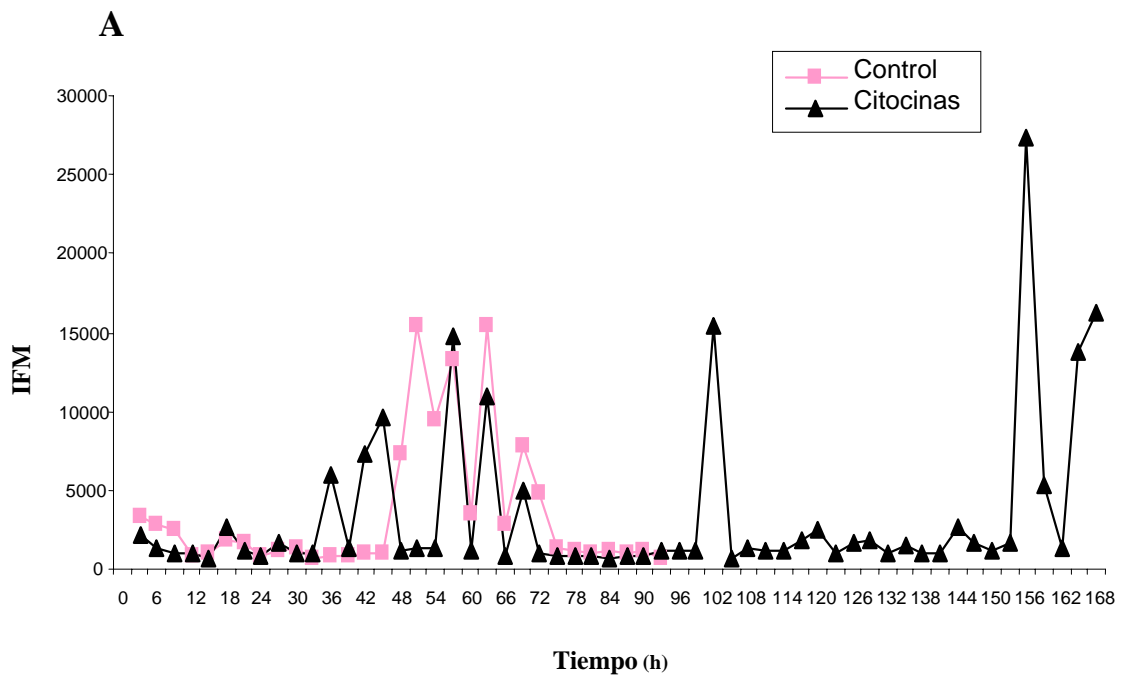
En el caso de la SPM, en la **Fig. 17A**, no se detectó IFM, durante las 168 h (7 días) de cultivo en presencia de citocinas; no obstante, en la condición control, luego de 72 h se presentaron altos niveles de fluorescencia emitida por las células. En lo que respecta al porcentaje, en la **Fig. 17B**, se detectó el mismo comportamiento que el observado para la IFM; situación que podría indicar que la proteína CDK4 en SPM no participa en la progresión del ciclo celular.



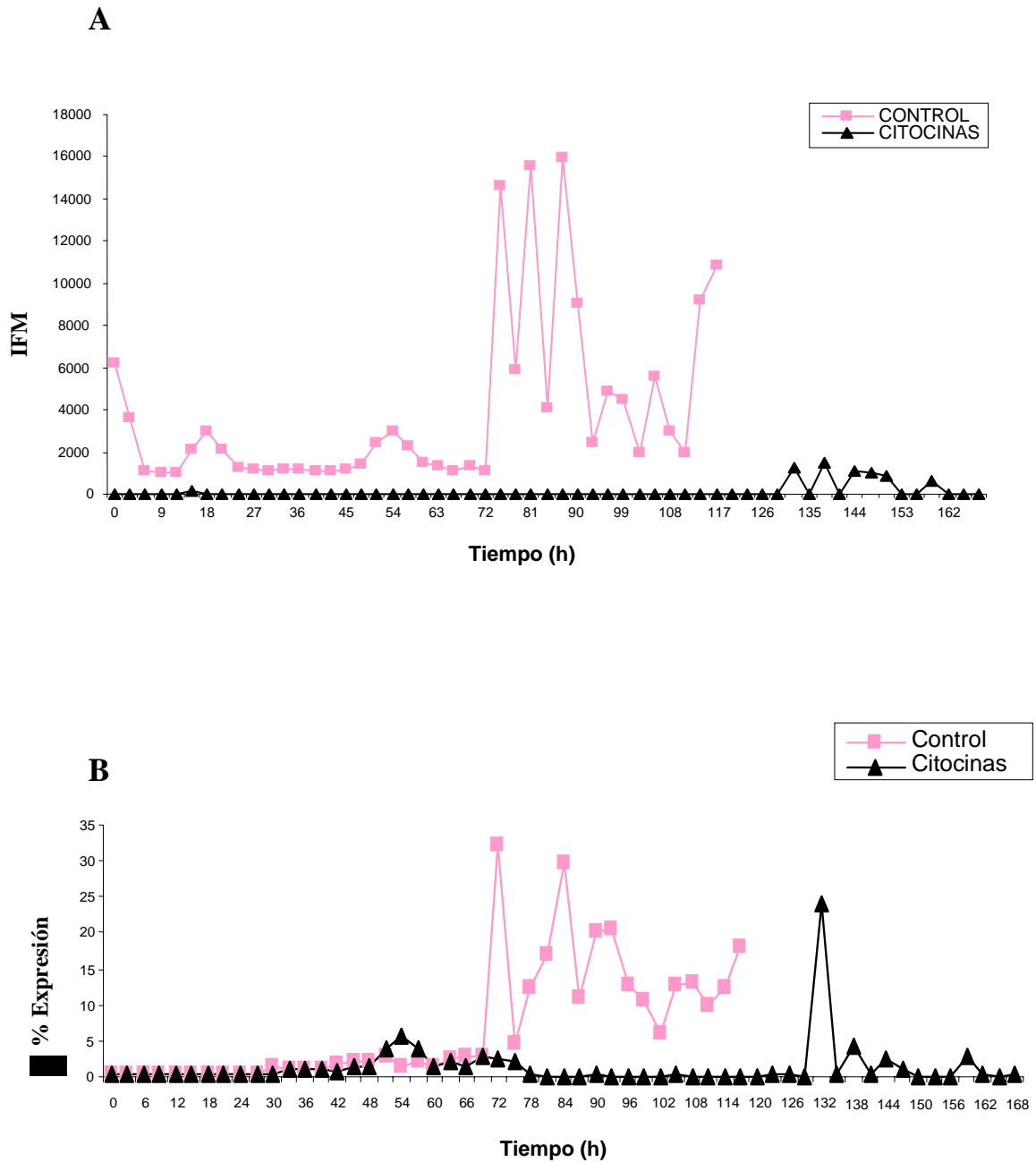
**Fig. 14. Expresión de la Ciclina D3 en células  $CD34^{+}Lin^{-}$  de SCU.** La población enriquecida en células  $CD34^{+}Lin^{-}$  de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre de citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de las citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la ciclina D3 conjugada con FITC. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el porcentaje de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.



**Fig. 15. Expresión de la Ciclina D3 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre de citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de las citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la ciclina D3 y conjugada con FITC. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el % de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.



**Fig. 16. Expresión de CDK4 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre de citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de las citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la ciclina CDK4 conjugada con PE. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el % de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.

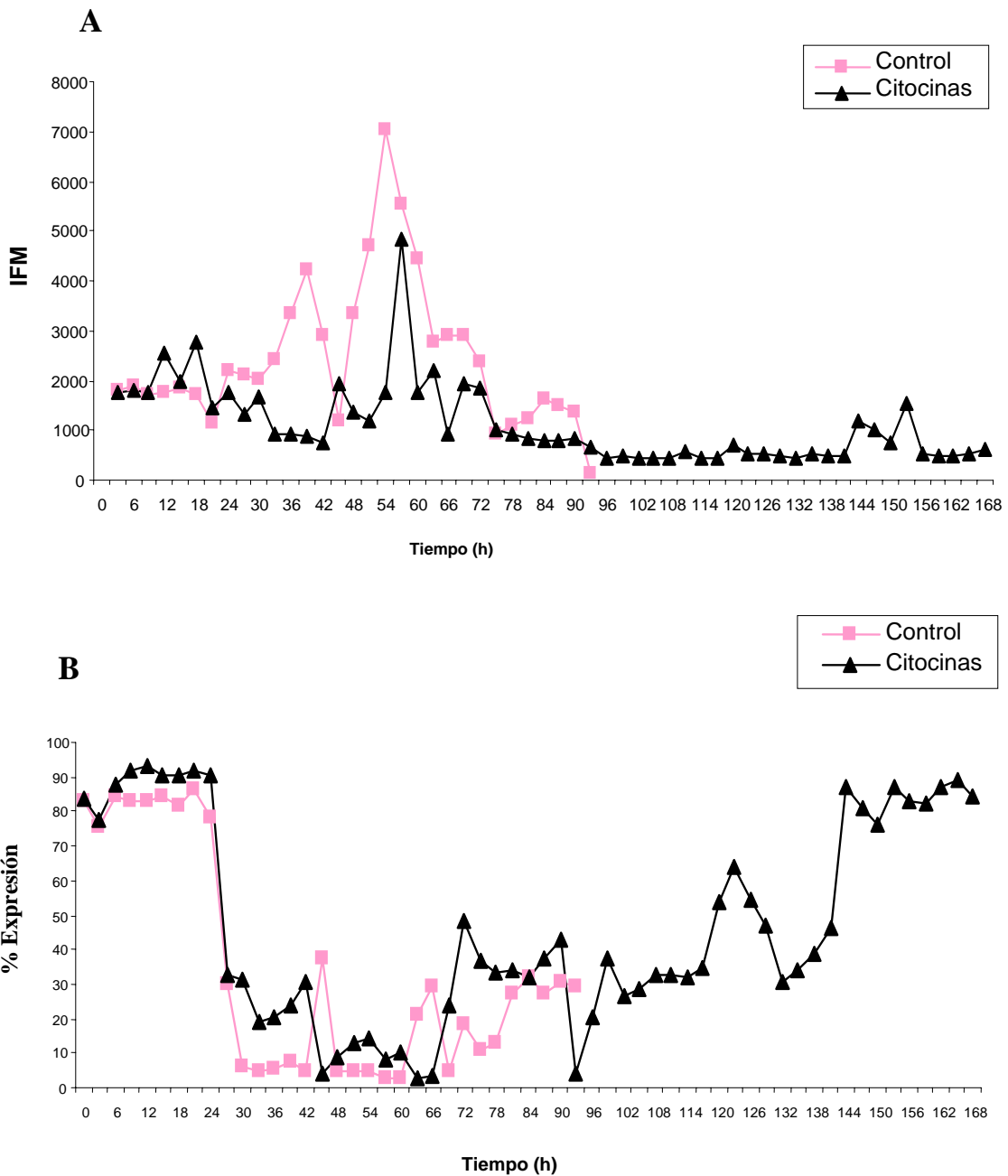


**Fig. 17. Expresión de CDK4 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre de citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de las citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la ciclina CDK4 conjugada con PE. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el % de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.



Por otra parte, en lo que respecta al CDKI p16, en SCU (**Fig. 18A.**), presentó una tendencia similar en la expresión en ambas condiciones de cultivo (control y citocinas) aunque en el control la fluorescencia fué mayor y sólo se expresó hasta 96 h de cultivo, y en presencia de citocinas después 72 h de variaciones en la fluorescencia emitida, se mantuvo una constante y baja expresión hasta 168 h.

Luego de graficar el porcentaje, en la **Fig. 18B**, se detectaron niveles de expresión por arriba del 90% por 24 h, lo cual correlacionó con el tiempo que tardaron en progresar las células en el ciclo celular (**Fig. 13A**) con el incremento en la fase S y una disminución de la fase G0/G1. Posterior a ésto se observó una tendencia cíclica en el porcentaje de expresión, ya que a 27 h la población celular se redujo a un 30% por 15 h, luego volvió a reducirse a un 15% en promedio por más de 20 h y hasta después de 65 h se incrementó y se mantuvo constante por arriba del 30 % por aproximadamente 18 h, disminuyó, se mantuvo por más de 6 h, y luego volvió a subir hasta un 30% por 18 h en promedio (100 y 120 h), nuevamente se incrementó por 12 h a un 50% en promedio, bajó y de 144 h hasta 168 h se mantuvo en un porcentaje similar al detectado las primeras 24 h con 80% de expresión en promedio.

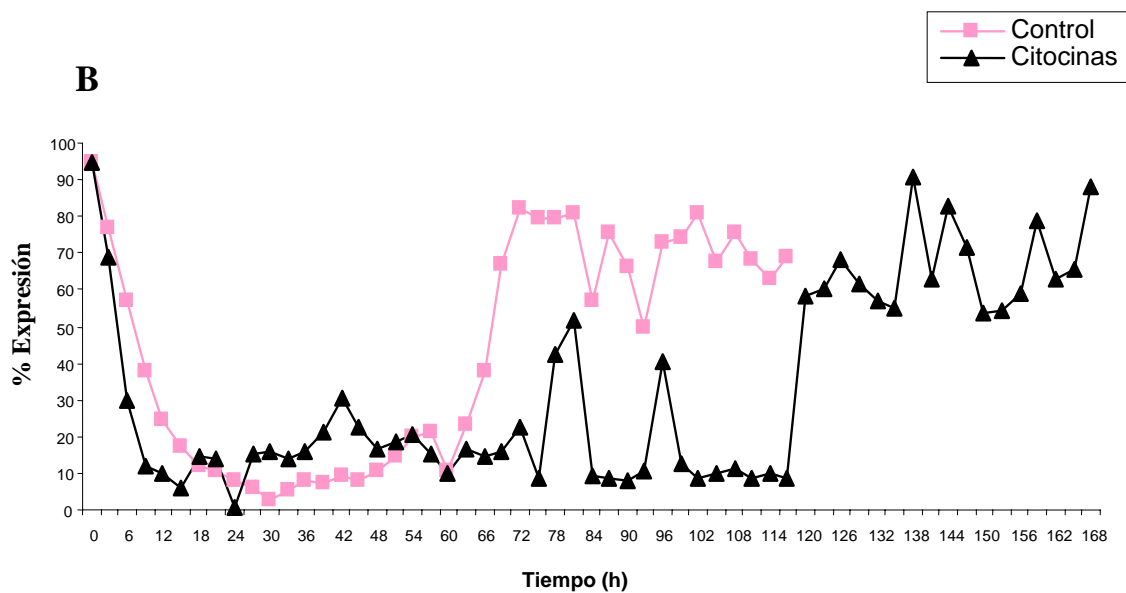
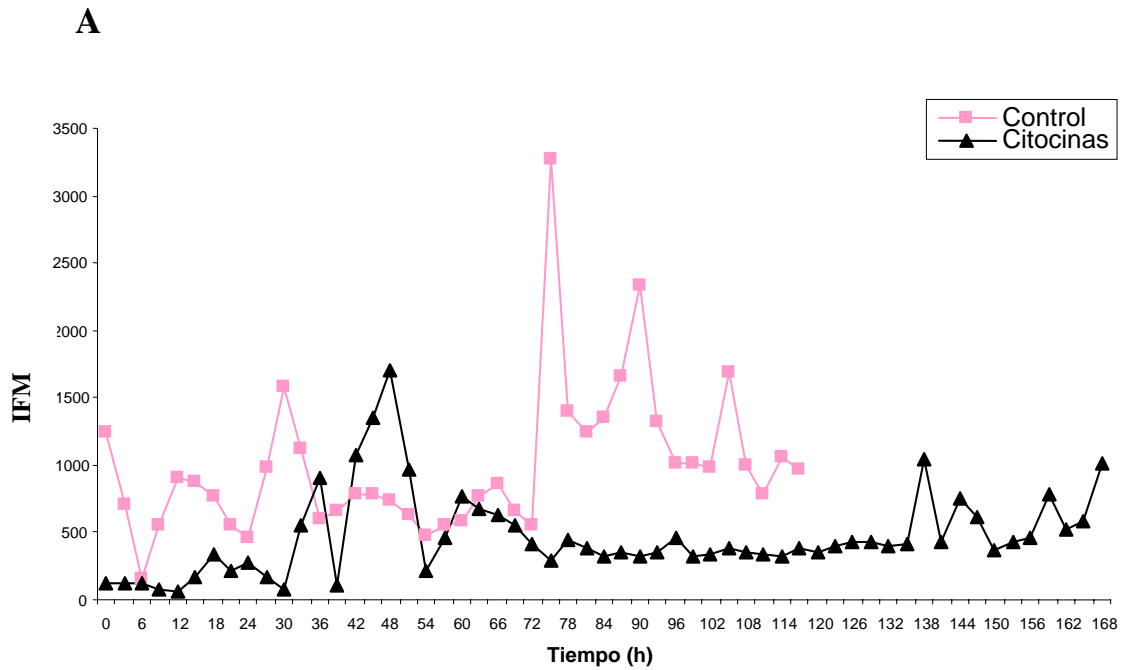


**Fig. 18. Expresión de p16 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre de citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de las citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la proteína p16 conjugada con FITC. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el % de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.

En el caso de la SPM y con respecto a la IFM, en la **Fig. 19A**, se observa como en la condición con citocinas hubo un incremento en la expresión a partir de las 30 h, con algunas variaciones por aproximadamente 48 h, y luego de 72 h, se mantuvo un nivel de expresión constante por 60 h y finalmente otro incremento que inició a partir de las 132 h que se mantuvo por 33 h hasta las 168 h. En la condición control, en general, el nivel de expresión se mantuvo por arriba de la condición con citocinas desde el inicio del cultivo, con algunas variaciones hasta las 36 h y a partir de este tiempo y por 36 h se mantuvo un nivel bajo hasta después de 72 h, tiempo en el que se incrementó la expresión y se sostuvo así por 48 h y luego de 120 h ya no hubo células en el cultivo.

Al evaluar el porcentaje de expresión (**Fig. 19B**), desde el inicio del cultivo, casi el 100% de la población expresó la proteína; sin embargo ésta fue disminuyendo a casi 10-15% en promedio luego de 12 h de cultivo y se mantuvo relativamente constante con ligeras variaciones por casi 66 h y hasta 75 h del cultivo, luego de este tiempo se incrementa el porcentaje de expresión, y disminuyó por aproximadamente 36 h para que después de 120 h la población aumentó la a expresión a más del 60% hasta el final del experimento. Este resultado, al igual que observado en las células de SCU podría correlacionar con el tiempo de quiescencia constante detectado en SPM (**Fig. 2**).

Para la SCU (**Fig 20A**) el inhibidor del ciclo celular p21, mostró una patrón de expresión muy parecido al detectad a la IFM emitida por la Ciclina D3 en presencia y ausencia de citocinas, no obstante la fluorescencia vista en p21 es menor a la emitida por la Ciclina D3. Desde el inicio del cultivo y hasta 24 h se observó la máxima expresión; es importante comentar que esto correlaciona con lo observado en la progresión del ciclo celular (**Fig. 13A**), ya que a este tiempo, la quiescencia se redujo y la fase S se encontró en un punto máximo de expresión del primer ciclo celular.

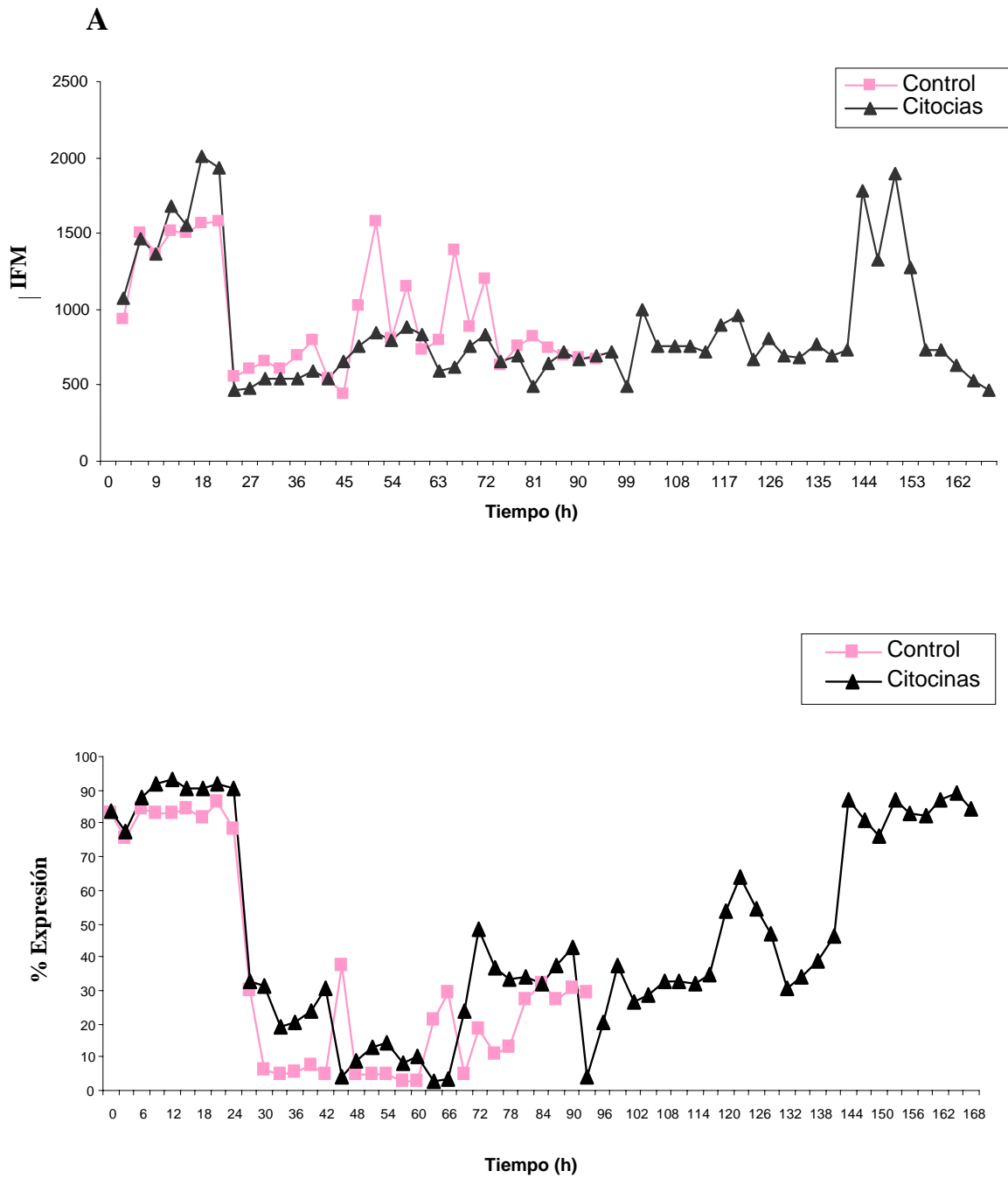


**Fig. 19. Expresión de p16 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre se citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la proteína p16 conjugada con FITC. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el % de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.

Posterior a este tiempo la fluorescencia emitida disminuyó y se mantuvo constante con algunas variaciones por 120 h (5 días de cultivo) hasta 114 h, luego aumentó por aproximadamente 15 h a partir de las 114 h, con una fluorescencia similar a la detectada las primeras 24 h del cultivo y finalmente volvió a disminuir hasta el final del experimento (168 h).

Al evaluar el porcentaje de expresión (**Fig. 20B**), la población celular también mostró una tendencia similar a la detectada en p16, y en forma cíclica durante los 7 días de cultivo; desde el inicio del cultivo con una expresión constante del 80% en promedio por 24 h, una disminución a un 15% por 24 h (de 24 a 48 h), una baja a porcentajes apenas detectables por 24 h (de 48 a 72 h), un nuevo incremento aproximado entre el 20 y 40% por otras 14 h, y nuevamente una disminución constante con ligeras variaciones con un tiempo aproximado de 40 h que va de las 96 a las 135 h y finalmente un nuevo incremento con un tiempo aproximado de 24 h y que llega hasta más del 75 % de expresión al final del cultivo. Este último ciclo de expresión podría tener una correlación con el tiempo en que se mantiene la quiescencia observado en la la progresión del ciclo celular detectada en la (**Fig. 13A**) a partir de 144 h en donde un alto porcentaje de la población se mantiene quiescente y no se pueden detectar ciclos celulares.

En las células de SPM (**Fig. 17A**), la IFM emitida fue baja desde el inicio del cultivo y hasta por 20 h; no obstante a partir de las 24 h, la fluorescencia se incrementó y se mantuvo relativamente constante durante aproximadamente 48h para luego disminuir ligeramente y nuevamente mantenerse así hasta las 135 h, tiempo en el cual se presentó un ligero incremento poco significativo y que llegó al final del cultivo. Es interesante mencionar, que en el caso de la condición control, la fluorescencia se incrementó desde las primeras h y logró superar a la expresión dada por la condición de células en presencia de citocinas hasta 120 h.

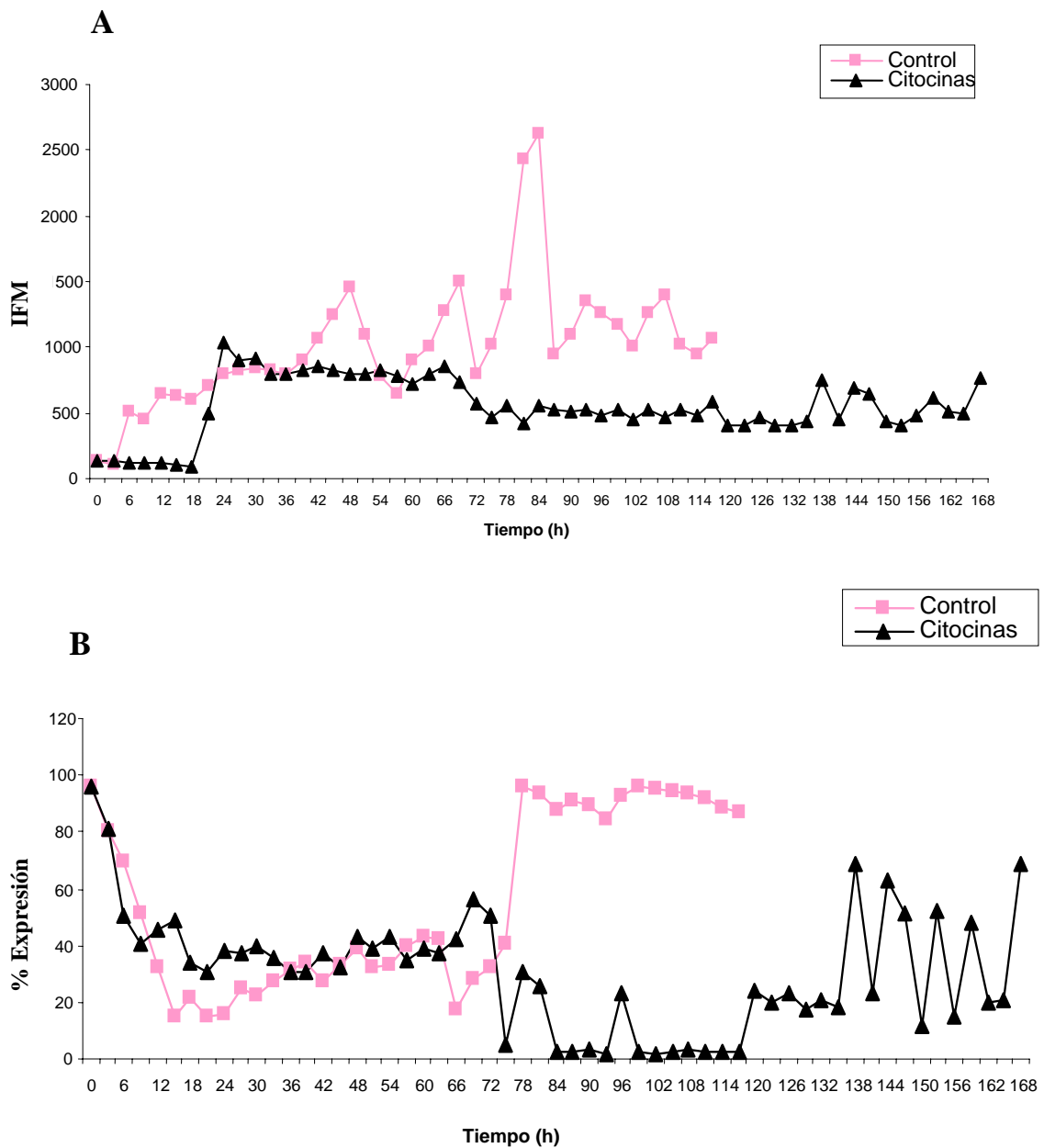


**Fig. 20. Expresión de p21 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre se citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la proteína p21 conjugada con FITC. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el % de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.

Luego de analizar el porcentaje de expresión de toda la población (**Fig. 21B**), se detectó que de casi un 100% de la población fue positiva para p21, ésta disminuyó su expresión en las primeras 9 h de cultivo a un 40% en promedio y esto se mantuvo constante (aproximadamente por 60 h) hasta 72 h. Este comportamiento también se presentó en la condición control; sin embargo, luego de éste tiempo, se incrementó la expresión a niveles similares a los detectados al inicio del cultivo. En la condición con citocinas, la fluorescencia se redujo a menos del 5 % y así se mantuvo por casi 40 h, para que después de 120 h volver a incrementarse con picos de expresión muy variables cuyos porcentajes oscilaron en promedio del 65%.

Otro miembro de la familia de inhibidores analizado fue p27, y en la SCU (**Fig. 22A**) se mostró como la fluorescencia emitida desde el inicio del cultivo y hasta las 20 h fue baja y constante, a partir de éste punto se incrementó y se mantuvo sin cambios aproximadamente por 9 h, interesantemente, este comportamiento también se observó en la condición control, no obstante su expresión superó al alcanzado en la condición con citocinas a 30 h de cultivo, pero a 48 h disminuyó, se mantuvo constante y sin cambios significativos. En la condición con citocinas a este tiempo se observó otro pico de alta fluorescencia y así sucesivamente se detectó una serie de puntos de máxima fluorescencia que disminuyeron a 120 h (5 días de cultivo) se mantuvieron constantes en un nivel que no llegó a ser el mismo detectado desde el inicio del cultivo.

Un detalle interesante es que este tiempo también correlaciona con el tiempo en el cual el 60 % de la población se mantiene constante en las fases G0/G1 del ciclo celular (**Fig. 13A**) y en donde no se detectaron ciclos definidos y esto sucedió hasta el final del ensayo (7 días de cultivo).



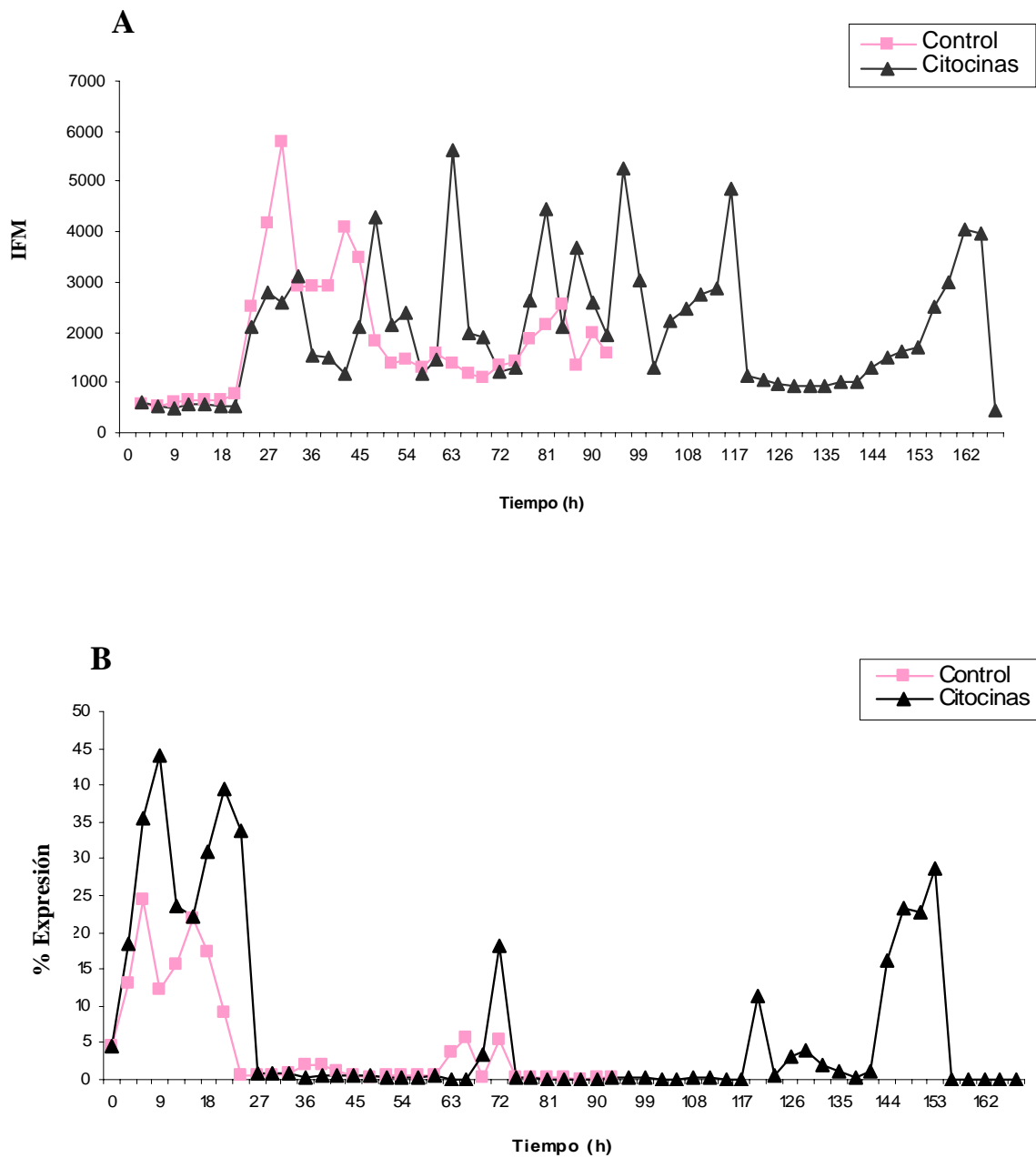
**Fig. 21. Expresión de p21 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre se citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la proteína p21 conjugada con FITC. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el % de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.



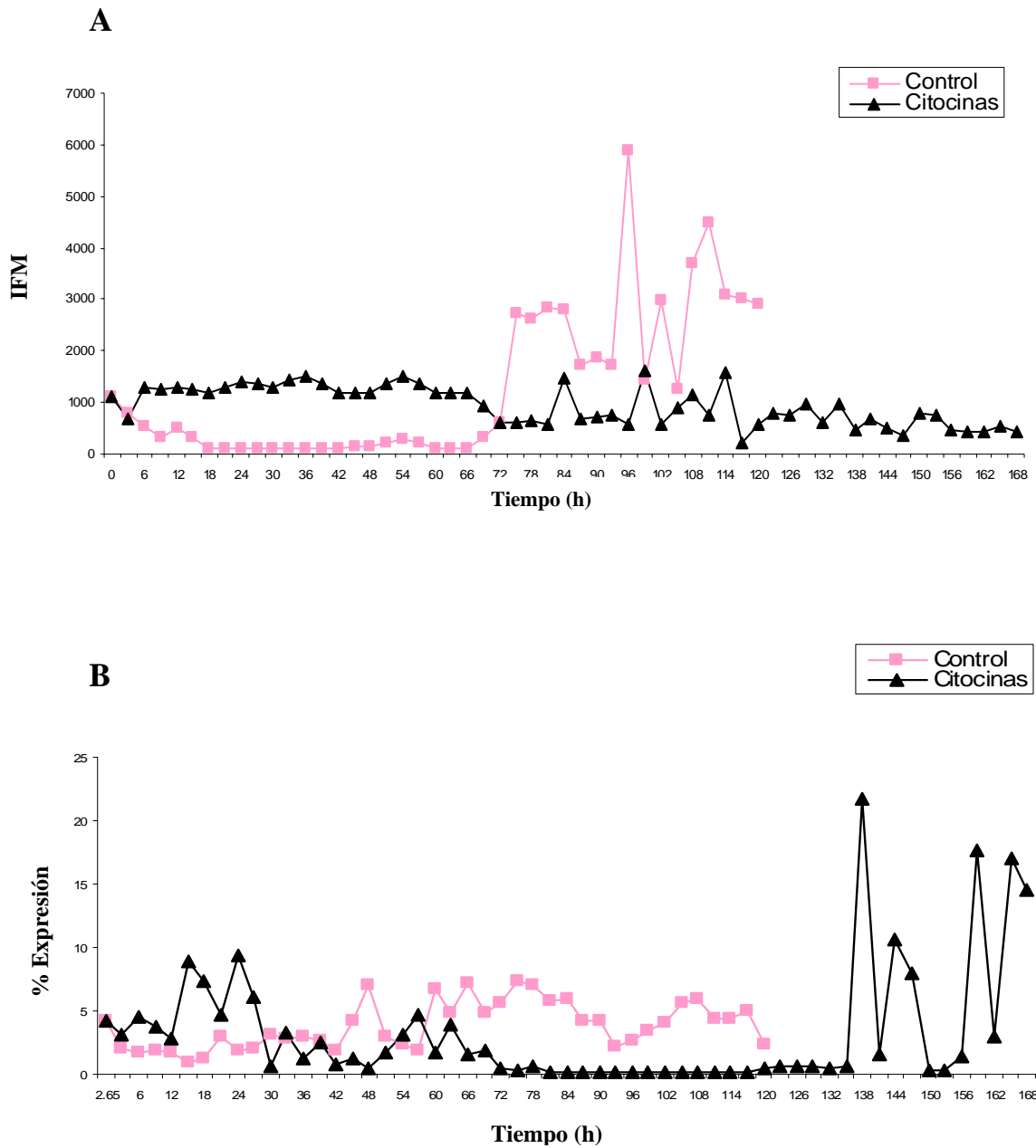
Cuando se evaluó el porcentaje de la población que expresa la proteína p27 (**Fig. 22B**), se detectó que aproximadamente 5% de ésta era positiva para la molécula y a partir de este punto, en presencia de citocinas se incrementó la población a un 45%, no así para aquellas células que estuvieron en ausencia de citocinas, en donde la fluorescencia emitida siguió el mismo patrón de comportamiento, pero éste no superó al porcentaje alcanzado en la condición con citocinas. Luego de 24 h en ambas condiciones de cultivo, se detectó una disminución muy marcada que llegó a porcentajes apenas detectables y que se mantuvieron así a lo largo del cultivo con algunos picos de expresión alta, los cuales fueron muy evidentes al final del ensayo.

En las células de SPM, los niveles de expresión se mantuvieron bajos y de forma constante sin cambios significativos desde el inicio del cultivo, a diferencia de lo detectado en SCU (**Fig. 23A**) mientras que en la condición control desde las 72 h y hasta 120 h, se detectaron variaciones en los niveles de expresión, mismos que superaron el comportamiento observado en los cultivos en presencia de citocinas. Estas diferencias en los niveles de expresión, sugieren una participación importante de la molécula inhibidora del ciclo celular p27, en la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU y en las células de SPM un nivel de expresión basal.

Al igual que en SCU, al analizar el porcentaje de la población positiva para p27, en SPM (**Fig. 23B**), se encontró que no más del 5% de las células expresó la molécula. Después de 12 h y hasta 27 h se incrementó a 10% su expresión y luego se redujo a las 30 h a un porcentaje apenas detectable y a partir de este momento ya no se detectaron variaciones importantes en la población sino hasta luego de 135 h, en donde se observaron picos de expresión que llegaron al 20% y cuya expresión osciló entre las 135 y 168 h del cultivo.



**Fig. 22. Expresión de p27 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre se citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la proteína p27 conjugada con PE. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el % de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.



**Fig. 23. Expresión de p27 en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM.** La población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, fue cultivada en medio de expansión libre se citocinas (Control) y medio de expansión en presencia de citocinas (Citocinas) IL-3, IL-6, SCF, GM-CSF, GCS-F, TPO, FLT-3. Las células fueron cosechadas cada 3 h hasta 7 días de cultivo, fijadas, permeabilizadas, e incubadas con anticuerpo monoclonal específico contra la proteína p27 conjugada con PE. Se analizaron 30, 000 eventos en citómetro de flujo y se graficó la intensidad de fluorescencia media (IFM) (A) y el % de expresión (B). Se muestra un experimento representativo de 3.

## VI.2.6. Discusión

Existen reportes en la literatura que han demostrado que un alto porcentaje de las CTH y las CPH de la MO, SPM y la SCU se encuentran en la fase G0/G1 del ciclo celular, en estos trabajos el análisis ha sido realizado en fracciones celulares que han sido obtenidas mediante la expresión del antígeno CD34, o bien a través de la tinción del ADN y el ARN en el que se incluye a células primitivas, progenitores multipotentes y progenitores comprometidos (Uchida et al., 1997; Furukawa, 1998; Summers et al., 2001).

A diferencia de lo descrito en la literatura, en este estudio se trabajó con una población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, en la que se incluye un perfil diferencial de maduración celular importante entre las CTH y las CPH, y en el que la capacidad de respuesta es muy amplia, ya que de acuerdo a trabajos previos y por los de nuestro grupo de trabajo, la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> obtenida mediante selección negativa tiene una gran respuesta proliferativa y de expansión en presencia de diferentes combinaciones de citocinas (Martínez-Jaramillo et al., 2004; Flores-Guzman et al., 2005).

Primeramente se encontró, mediante la incorporación de YP, que un alto porcentaje de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU ( $83.8 \pm 7.2\%$ ), así como de SPM ( $86.6 \pm 7.1\%$ ) son quiescentes (Fase G0/G1) en el momento de la colecta. De esta forma, se demuestra que no existen variaciones importantes que pudieran marcar la diferencia en el potencial proliferativo demostrado en los primeros días de cultivo en este estudio y en trabajos previos con los que podemos correlacionar este aspecto (Martínez-Jaramillo et al., 2004; Flores-Guzman et al., 2005; Tanavde et al., 2002).

No obstante, y de acuerdo con esto, en la literatura se han reportado algunas diferencias en los porcentajes de las fases del ciclo celular, y esto podría estar relacionado al método de selección utilizado: Traycoff et al., 1994 detectó que 97.5% de las células CD34<sup>+</sup> de SCU se encuentran en la fase G0/G1 antes del inicio del cultivo (Traycoff et al., 1994), y Rosti et al., reportó un 96% (Rosti et al., 2000). Asimismo, se ha podido evidenciar por otros estudios, que las CTH se

encuentran en las fases S y G2/M del ciclo celular en porcentajes no mayores al 5% (Gothot, et al., 1997), y en nuestro trabajo hemos visto que la proporción de las células en las fases S en SCU es de  $3.4 \pm 2.1\%$  y en SPM es de  $9.1 \pm 3.5\%$  mientras que en la fase G2/M es  $12.8 \pm 3.4\%$  para SCU y de  $4.3 \pm 6.14\%$  para SPM. Con respecto a lo reportado en la literatura se tiene que 1.6% de las células CD34<sup>+</sup> de SCU se encuentran en la fase S y 2.3% en la fase G2-M (Rosti et al., 2000); y en el caso de la SPM, se ha reportado que 11% de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> se encuentran en la fase S/G2/M (Uchida et al., 1997).

Ahora bien, con respecto a lo descrito antes, es importante mencionar que la población no fue separada y analizada en las fases G0 o G1 del ciclo celular, y de esta forma, ver diferencias en su capacidad proliferativa y de expansión. En este trabajo se tomó en conjunto como una población G0/G1 con las fases S y G2/M. Sin embargo, las diferencias observadas en la literatura con respecto a las diferentes fases del ciclo celular vistas en nuestro modelo de estudio, a pesar de ser bajas podrían estar relacionadas a la composición de la población utilizada, ya que en nuestro proceso de selección negativa, estamos enriqueciendo a la población en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> entre un 55 y 75% del total de las células obtenidas, lo que indica que la proliferación y expansión de las células progenitoras hematopoyéticas generadas en nuestro trabajo, puede ser el resultado *in vitro* de cuando se cultiva una población celular en el que las células CD34<sup>+</sup> comprenden más del 50% del total de las células, además de que las células fueron depletadas (aunque no al 100%) de marcadores de linaje de diferenciación específicos para CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66-β y Glicoforina A (Flores-Guzmán et al., 2002; Flores-Guzmán et al., 2005).

Por otra parte, se encontró que así como la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU y SPM, la población de CMN ( $80.5 \pm 6.2\%$  y  $92.8 \pm 3.9\%$  respectivamente) también presentan altos porcentajes de quiescencia, lo cual podría estar relacionado con el tiempo en el que se procesaron las muestras, aunque cabe aclarar, que la obtención de las poblaciones se llevo a cabo en un tiempo no mayor a 6 hrs, y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la separación.

Sin embargo, en el caso de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas éste podría ser tiempo suficiente para que pudieran entrar en un estado de quiescencia, debido al estres producido por un cambio en la temperatura, que podría indicar una alta sensibilidad luego de la extracción de su microambiente, puesto que la progresión a través del ciclo celular es sensible a la temperatura, aunque la relación no es directa; ya que algunos tipos de células de mamífero fallan en pasar la transición de G2 a M, luego de mantener una temperatura de 37°C y cambiar a 20°C ó 16°C, conocida como una hipotermia moderada, aunque no se descarta la posibilidad de que se active un checkpoint en respuesta al shock térmico que transitoriamente inhiba la transición G1 a S y esto lleve a las CMN a un estado de quiescencia similar al detectado en la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (Rieder y Cole, 2002).

Particularmente, en clones de eritroleucemia de ratón, que ectópicamente expresan un alelo mutante de p53, sensible a la temperatura, se ha visto que una disminución de 37°C a 32°C, produce la acumulación de las células en la fase G1 del ciclo celular y apoptosis inducida por p53; no obstante al pasarlas nuevamente a 37°C y en presencia de citocinas logran un efecto reversible (Lin y Benchimol 1997).

Una característica de las células troncales hematopoyéticas es su relativa quiescencia *in vivo*, una propiedad considerada importante para su función biológica. Esto tiene como resultado un ciclo de división celular lento que puede llevar de 2 a 4 semanas y una baja tasa de crecimiento celular *in vivo* (definida por una disminución del tamaño celular y un bajo contenido de moléculas) ambas características muy contrastantes en relación a su progenie, la cual experimenta una rápida tasa de división celular y crecimiento que las conlleva a una diferenciación terminal.

Finalmente el ciclo de división celular producido en un tiempo lento por las CTH *in vivo*, cambia cuando éstas son aisladas y tratadas *in vitro*, primero experimentan un importante retraso del comprometimiento a su primera división celular en respuesta a la estimulación con citocinas recombinantes; no obstante, presentan un alto potencial, que se distingue entonces de las células

hematopoyéticas más maduras, y que después de la primera división celular, su tasa de proliferación celular se puede incrementar exponencialmente o mantenerse refractaria, a pesar de la combinación de citocinas utilizadas.

De acuerdo con esto, se procedió a cultivar a la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU en presencia de una combinación de siete citocinas (IL-3, IL-6, TPO, SF, FL, G-CSF, GM-CSF); y después de 7 días de cultivo se detectó en la población considerada nuevamente como pre-columna (CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>), que la quiescencia se redujo hasta un 50% (G0/G1 con menos del 40%), la fase S con más del 45% de la población (mayor que la pre-columna) y la fase G2/M similar a la del día cero luego del enriquecimiento.

Estos datos indican que la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, luego de 7 días de cultivo en presencia de las citocinas, inicia una respuesta proliferativa alta que se ve reflejada por un lado, en el número celular y por otro en cuanto a las fases del ciclo celular detectadas, particularmente en la fase S. Además de esto, se puede decir que hay cierta sincronía desde el inicio y luego de 7 días de cultivo, puesto que siguen un mismo patrón en los porcentajes de las fases G0/G1 S y G2/M en las poblaciones antes y después del enriquecimiento, aunque claro, con diferencias marcadas entre cada una de ellas.

A diferencia de lo observado en la SPM, en donde sólo en la fase G0/G1 se mantiene tal sincronía, ya que antes y después del enriquecimiento se conserva el mismo patrón, no así para las fase S post-columna y G2/M pre-columna en el mismo día 7. A este respecto, se sabe que para poder iniciar con un cultivo *in vitro* de células sincrónicas, generalmente en líneas celulares es necesario primero la eliminación del suero por 24 a 48 h, ó la deficiencia de algún aminoácido esencial. Esto va a depender del tipo de células, para que estas puedan alcanzar a una fase G0, o G0/G1, o en fases específicas del ciclo celular mediante inhibidores del crecimiento, los cuales puede llegar a causar alteraciones metabólicas que no logran una sincronía en todos los aspectos del crecimiento, además algunas células sincronizadas generalmente pueden disminuir su capacidad de supervivencia y no tener la eficiencia requerida para la proliferación (Zhang et al., 2005). Por lo que en nuestro caso no sería muy práctico realizar esta metodología,

aunque existen trabajos en los que se han sincronizado estas células mediante una disminución del O<sub>2</sub> en el cultivo.

Asimismo se detectó que en el día 14 y en el día 21, las células están ciclando en el momento de la cosecha y el enriquecimiento (pre y post-columna respectivamente) debido al alto porcentaje de células que se encontraron en la fase S. Sin embargo, se detectó en el día 14 que la fase G0/G1 se encuentra alta en SCU así como en SPM, pero ésta no llega a superar a la mostrada en el inicio del cultivo, y en el caso de la SPM esta tendencia se mantiene hasta el día 21, ya que en SCU logra incrementar la fase G0/G1 a porcentajes similares a los del inicio del cultivo.

Lo anterior nos hace pensar que a pesar de que las CTH y CPH que se encuentran jerárquicamente ordenadas en cuanto a la quiescencia, las células más inmaduras no se mantienen quiescentes y posiblemente en este tiempo inicien el tránsito a través del ciclo celular, o sólo una fracción de ellas, esto podría favorecer que algunas células puedan mantenerse hasta por 12 semanas; evento que ha llevado a la determinación de que las CTH ciclan con un intervalo de tiempo estimado de 4.3 semanas (30 días) (Bradford et al., 1997).

Es importante considerar que de acuerdo a los resultados generados, los primeros 7 días de cultivo son determinantes para diferenciar el potencial proliferativo y de expansión observado tanto en SCU así como en SPM, ya que de acuerdo al incremento en veces de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de la SCU obtenido en el día 7, éste se reduce entre el día 14 y el día 21. Este comportamiento es diferente al detectado en la SPM, en donde el incremento en veces mostrado en el día 7, 14 y 21, es muy similar al visto en el día 21 para la SCU.

Se ve en la SPM, que a pesar de la disminución de la quiescencia a día 7 y la síntesis entre el 40 y 50% en que se encuentra la población celular, antes y después del enriquecimiento, luego de la presencia de las citocinas en el cultivo, esto no se vea reflejado en la proliferación, lo que nos hace suponer que a pesar de ser una población celular altamente quiescente, enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, con una expresión entre el 55 y 75 % de la población positiva para el antígeno CD34, no tenga tal capacidad como la vista en la SCU.



No obstante, el hecho de encontrar que la IFM de las SCU es mayor que la de las células de la SPM, y luego de evaluar su potencial proliferativo y la proporción de las células en la fase S en respuesta a la combinación de citocinas utilizada, sugiere que la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de la SCU contiene un alto porcentaje de CTH y CPH. Esto podría demostrar algunas diferencias biológicas importantes entre el contenido de las CTH y CPH en SCU y SPM como lo visto en SCU y MO (Traycoff et al., 1994).

A este respecto, se han detectado fracciones celulares que logran dividirse y mantener el antígeno CD34, pero también se ha observado la presencia de células CD34 presentes en el inicio del cultivo, y que no responden al efecto de las señales intracelulares inducidas por los factores extrínsecos como es el caso de las citocinas luego de 10 días de cultivo (Traycoff et al., 1995).

Por otra parte, también es importante considerar los bajos niveles de actividad telomerasa detectados en células primitivas hematopoyéticas humanas, la cual es desregulada en respuesta a la activación del ciclo celular y a la proliferación inducida por citocinas, ya que se ha visto un acortamiento del telómero durante la proliferación de las células de la sangre. Particularmente se ha encontrado actividad telomerasa en células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> que exceden los niveles de las células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup> y en CMN, y en estas últimas esta muy relacionado con lo visto en nuestro estudio, en lo que corresponde a la presencia de CFC en SCU y la SPM, ya que es prácticamente ausente.

En el caso de la población enriquecida en las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> y su baja capacidad proliferativa en la misma SPM, podría ser el reflejo de un acortamiento del telómero, ya que de acuerdo a las etapas del desarrollo, se ha reportado que la actividad telomerasa es alta en las células CD34<sup>+</sup> de MO, seguida de la SPM y SCU, con una longitud del telómero de 7.6kpb, 7.4kpb y 10.4 kpb respectivamente (Engelhardt et al., 1997).

Las citocinas utilizadas en nuestro estudio inducen una respuesta semejante a la generada por los factores solubles producidos por el estroma en el microambiente hematopoyético, además de tener un efecto en forma independiente, así como en sinergia de acuerdo a las vías de señalización

intracelulares activadas por cada citocina. De esta manera podrían mantener a las células por largos períodos de tiempo, inducir la diferenciación temprana de ciertas fracciones celulares de CTH y CPH, pero también evitar la diferenciación terminal, ya que por ejemplo, algunas células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> de SPM o MO luego de 21 días de cultivo, mantienen el antígeno CD34, lo cual indica, que podrían tener el potencial de progenitores *in vitro*, tal como lo demuestran otros estudios y nuestro propio grupo, en donde a 28 días de cultivo en la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, luego de una selección se mantiene la capacidad de CFC (Flores-Guzman et al., 2006; Shah, 1996; Verfaillie, 1993).

Esto, en contraste con otros estudios, en donde se utiliza una población CD34<sup>+</sup> obtenida a través de una selección positiva por única vez, mediante citometría de flujo, y en donde la combinación de citocinas empleadas a lo largo del cultivo puede cambiar considerablemente el mantenimiento de la población de células troncales hematopoyéticas, la capacidad proliferativa, así como la diferenciación y los antígenos de linaje específicos de cada tipo celular que se van generando a lo largo de los cultivos *in vitro* (Donato et al., 2002).

Puesto que ha sido reportado que las células CD34<sup>+</sup> que se mantienen en la fase G0 del ciclo celular, pueden ser las mejores candidatas para examinar la progresión del ciclo celular y como consecuencia, la proliferación de las CTH y CPH (Summers et al., 2001). Aunado a lo anterior, se ha detectado la existencia de una alta actividad proliferativa en las células CD34 aisladas de la fase G0 y que además es superior a la actividad detectada en las células CD34<sup>+</sup> en la fase G1.

Asimismo, las células CD34<sup>+</sup> de SPM presentan un estado del ciclo celular más homogéneo en la fase G0/G1 temprana, debido a que la población no expresa células en la fase G1 tardía. Esto en relación a la presencia de las células progenitoras multipotenciales, las cuales se encuentran en subcompartimientos o fases G0/G1 tempranos, a diferencia del alto porcentaje de las células progenitoras restringidas al linaje granulocito-monocito detectado en la fase G1 tardía (Gothot et al., 1997). A este respecto se conoce la existencia de bajos números de células progenitoras CD34<sup>+</sup> circulantes en la fase S y G2/M y que además no se encuentran quiescentes en las fases G0 del ciclo celular, sino más

bien células en fase G1, lo que indica que las células CD34<sup>+</sup> de SPM, pueden ser consideradas equivalentes para la frecuencia tanto de CPH comprometidas y más inmaduras, aunque ellas muestren un perfil funcional y cinético diferente (Lemoli et al., 1998).

El estudio de la biología básica del ciclo celular de las CTH y CPH juega un papel importante en la manipulación y su utilidad en otras aproximaciones terapéuticas (terapia génica y expansión *in-vivo*). Trabajos recientes han proporcionado hallazgos en los mecanismos moleculares que controlan la división del ciclo celular y el impacto que este tiene en la autorrenovación. Tales estudios sugieren que variaciones en el control de ciclo celular puede alterar el fino balance entre las divisiones celulares de autorrenovación y diferenciación. Asimismo, existen evidencias de la participación de algunos de los reguladores del ciclo celular que funcionalmente pueden cooperar influenciando su actividad y esta puede estar dada por las condiciones de su microambiente para inducir la quiescencia o la proliferación.

La quiescencia de las CTH tiene una importancia biológica crítica en la protección del compartimiento de las células troncales, y en este aspecto los reguladores del ciclo celular, tales como p21, son pieza clave en este mantenimiento, ya que p21 es considerada el swicht molecular que gobierna la entrada de las células a ciclar y su ausencia favorece que las células progresen a través del ciclo y se pierda el pool de células troncales (Cheng et al., 2000).

En este caso, nosotros encontramos, que no sólo p21, sino que también p16, un miembro de la familia de INK (que tiene una participación limitada en la progresión del ciclo celular) se encuentra en un alto porcentaje de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> y en la población de CMN de SCU y SPM. Lo que demuestra que son esenciales en los procesos del ciclo celular, puesto que mantienen la quiescencia (ya que incluso se conocen como proteínas supresoras de tumores) (Furukawa, 2002).

Esto podría indicarnos que las células comprometidas a un linaje en particular y en condiciones fisiológicas normales, mantienen cierta quiescencia que puede estar dada, en función de las necesidades del mantenimiento del pool

de células maduras comprometidas en la sangre, o bien, cuando el organismo es retado por agentes externos, en el que las células del sistema inmunológico requieren ser activadas para llevar a cabo su función. Algo muy similar estaría ocurriendo con la SCU, en donde antes del nacimiento, el producto se encuentra en condiciones libres de antígenos, lo cual evita que las células maduras específicas de linaje lleven a cabo un proceso de activación. O bien, que las células maduras han alcanzado, un estricto límite en el potencial proliferativo en condiciones normales, un proceso conocido como senescencia replicativa, caracterizada por un arresto irreversible del ciclo celular y un acortamiento de la longitud de los telómeros.

Esta situación es característica de las células T que han sufrido extensivos ciclos de proliferación, conducidos por antígenos, o por un perfil alterado de citocinas en el microambiente, y en donde además se observa una resistencia a la apoptosis, esto debido a una pérdida de la sensibilidad al estrés y a varios cambios funcionales. Por lo que se ha podido ver, que éstas células pueden acumularse a lo largo de la vida de un individuo en condiciones normales y en jóvenes infectados con virus de inmunodeficiencia humana, o en algunos casos con patologías relacionadas con la edad y el cáncer (Effros et al., 2005).

Otro aspecto importante a considerar, es el hecho de que las células totalmente diferenciadas son arrestadas en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> para expresar eficientemente los genes necesarios para transitar en el ciclo y continuar con la fase S (Furukawa, 1997).

Es interesante ver como en el caso de la SCU, la expresión de p21 se mantiene alta, con porcentajes en promedio del 80% entre los días 7, 14 y 21; mientras que en SPM el porcentaje es significativamente diferente y muy por debajo del 80% en los mismos días del cultivo, aunque ya en el día 21, el porcentaje supera al 60% de la población. Este hecho podría tener relación con que p21, así como puede ser una pieza clave en la inhibición de la progresión del ciclo celular y mantener la quiescencia de las células, también puede ayudar a la formación de los complejos Ciclina-CDK y su transportación al núcleo, para que de esta manera, se pueda favorecer la progresión del ciclo celular, y como

consecuencia, la proliferación (Roberts, 1999). Evento que posiblemente también se podría estar llevando a cabo a través de p16, ya que se encuentra altamente expresada (80%) en la fracción de CMN y en la enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU y SPM. Esto desde el inicio y al final de los días de la evaluación del cultivo (D0, 7, 14 y 21), antes y después del enriquecimiento de la población CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>; no obstante, esto, podría depender de los niveles de expresión de las proteínas.

Como una forma de analizar la presencia de diversos reguladores del ciclo celular en forma de proteína se utilizó el citómetro de flujo, una herramienta que nos aporta entre otros aspectos, información acerca de la presencia o ausencia de algún antígeno en particular; sin embargo, es importante determinar los parámetros a evaluar. Dentro de los parámetros analizados en este trabajo están los porcentajes de expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular, que nos indica el número de células que presentan tal proteína. Otro dato que también fue considerado es la intensidad de fluorescencia media (IFM), que indica la fluorescencia emitida por célula, que equivale al número de moléculas presentes por célula, esto interpretado en unidades arbitrarias. Así entre mayor sea el número de moléculas por célula, mayor es la IFM.

Estos dos aspectos evaluados aportan información que no necesariamente indican lo mismo, ya que de acuerdo a los niveles de expresión diferencial podrían sugerir funciones particulares como son: la progresión, la inhibición del ciclo celular, o únicamente la presencia en el citoplasma hasta que sea requerida su participación a través de las interacciones con sus moléculas blanco, y cuyos eventos van a depender del destino particular de cada célula.

Los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (INK) se unen y regulan directamente la actividad catalítica de los complejos Ciclinas-CDK involucradas en el control del ciclo celular, esto a través de un mecanismo secuencial que involucra el plegamiento y la unión. Un primer paso en el mecanismo cinético es la interacción de un pequeño dominio altamente dinámico de los reguladores, con la ciclina que forma el complejo, seguida de una región que se une a la CDK y a través una región menos flexible del inhibidor. Así, las interacciones ciclinas-

inhibidores son un evento determinante de la especificidad de los inhibidores a través del ciclo celular. Lo que sugiere que los inhibidores seleccionan sus blancos unidos específicamente a la subunidad de las ciclinas de los complejos formados por las Ciclinas-CDK (Lacy et al., 2005).

Sin embargo, de acuerdo a lo observado en cuanto a la IFM, se pudo detectar que las poblaciones expresan niveles muy bajos de la molécula p16 y sólo en el caso de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM se encuentra elevado en el Día cero (D0), lo que sugiere que este nivel de expresión puede en combinación con p21 y p27 mantener por más tiempo la quiescencia observada durante las primeras hrs del cultivo, y como consecuencia de esto, alargar el tiempo de duplicación de las células en presencia de citocinas.

Cabe mencionar que la combinación de citocinas usada en este trabajo ya ha sido analizada previamente, y se sabe que una combinación de citocinas de acción temprana, intermedia y tardía en los cultivos de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, asegura que se puedan activar diversas vías de señalización intracelular, y por consiguiente una mayor respuesta proliferativa, cuyo destino celular podría estar dirigido en parte por la combinación de tales citocinas. Puesto que ahora se sabe que cuando los cultivos son suplementados con SCF, IL-3, IL-6 y EPO, se observa una rápida proliferación celular con una estimulación dirigida hacia el linaje eritroide durante los primeros 10 días de cultivo, o bien un alto nivel de proliferación y expansión de células progenitoras en presencia de SCF, IL-6, GM-CSF y G-CSF con una estimulación preferencial hacia el linaje mieloide, que se puede mantener en un período de más de 30 días en cultivo (Flores-Guzmán et al., 2002; Mayani et al., 1993; Metcalf y Nicola, 1995; Martínez-Jaramillo et al., 2004).

### **Tiempo de doblaje.**

El tránsito de las células a través del ciclo celular y los eventos relacionados con los procesos de proliferación y diferenciación, implica la expresión de diversas moléculas, como las ya evaluadas anteriormente, sin embargo, estas moléculas tienen un tiempo de vida corto, por lo que el detectar diferencias en cuanto a

niveles de expresión durante los días marcados (7, 14 y 21) aporta información interesante en cuanto a la presencia de éstas en el momento de la colecta de las células, antes y después del enriquecimiento a lo largo de los días de cultivo. Sin embargo, al detectar diferencias importantes en los primeros 7 días de cultivo, sugiere una mayor participación y función de la formación de complejos entre las diversas moléculas, lo que podría favorecer una progresión continua en un tiempo determinado, y marcar la diferencia entre SPM y SCU.

Uno de los primeros eventos a analizar en tiempos cortos fue el tiempo de duplicación; y en este aspecto se logró encontrar que la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU experimentó un primer tiempo de duplicación de 33 hrs, más corto que el observado en las de SPM, con 45 hrs. En relación con esto, al analizar la progresión del ciclo celular durante los primeros 7 días de cultivo mediante YP, se logró encontrar al menos 10 ciclos celulares en SCU con respecto a 7 detectados en SPM, en donde el primer tiempo fue el más largo; sin embargo los subsecuentes fueron relativamente más cortos y al final de la determinación, el tiempo más largo detectado se observó en SCU. Este punto es interesante, ya que la falta de expresión de suficientes receptores para factores de crecimiento podrían limitar la entrada al ciclo celular, lo cual también podría estar muy relacionado con el estado ontogenético de donde se obtienen las muestras y del estado de madurez de las mismas células. Tal es el caso de la baja expresión de c-kit, la cual podría prolongar la entrada al ciclo celular en células CD34<sup>+</sup> de SPM de 36 hasta 90 hrs, dependiendo de las condiciones del medio y de la posible participación del TGF- $\beta$  endógeno, que podría evitar que las células transiten a través del ciclo celular (Morita et al., 2003). Otra causa podría ser que las células pierdan esa respuesta proliferativa luego de un determinado tiempo de cultivo; ya que se ha visto que la presencia del Ligando de FLT-3, SCF y TPO, en células CD34<sup>+</sup> de SCU luego de tres semanas en cultivo, favorece en promedio que se dividan 5 veces, mientras que las de SPM se dividen sólo dos (Tanavde, 2003).

Por lo que el hecho de utilizar citocinas de acción temprana sólo mantiene la población de las CTH y CPH en términos de expansión, y el utilizar las citocinas

de amplio espectro asegura que éstas puedan prender diferentes rutas de señalización, las cuales pueden ser activadas de forma intracelular, sin ser necesaria su expresión en la membrana y de igual manera activar la respuesta de células CD34<sup>+</sup> más maduras.

### **Fases del ciclo celular.**

Otro punto importante a analizar, fue el hecho de que al evaluar la progresión del ciclo celular pudimos observar que un porcentaje considerable en la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de los dos modelos de estudio, se mantiene quiescente a lo largo del cultivo a 7, 14 y 21 días y en tiempos cortos (cada 3 hrs hasta cubrir 7 días de cultivo), lo que sugiere que una pequeña población de las células se encuentra dentro del pool de CTH y CPH que no ciclan a pesar de la presencia de las citocinas, aunque algunas pueden ciclar luego de 4 ó 5 días de cultivo, mostrando diferentes tipos de divisiones celulares, dando como resultado diferentes potenciales de diferenciación y autorrenovación (Yan et al., 2003).

No obstante, si relacionamos este potencial proliferativo con lo visto en las células CD34<sup>+</sup> de la SCU y la alta proporción de su fenotipo (CD34) que ya habíamos detectado antes, sugiere que las células de SCU contiene un alto porcentaje de CTH; lo que correlaciona con que luego de 5 días de cultivo se incrementa la población 11 veces en SCU, comparada con MO en donde solo hay un incremento de 5 veces (Traycoff et al., 1994), similar a lo visto en nuestro estudio y en relación con las células de SPM. En este sentido, se desconoce cuales y cuantas células van a permanecer como una fracción de la población refractaria a citocinas y que conserven las características de multipotencialidad, o bien, que la pierdan durante el cultivo, y que mantengan una tasa de proliferación lenta, lo que en un momento dado podrían incrementar drásticamente la proliferación, y aún en cultivo, mantener un estricto balance entre el número de células que mantienen el pool original y entre las que proliferan, se diferencian y llegan a formarse en elementos maduros con una función particular (Marone et al., 2002).



Se ha observado que una estimulación secuencial de citocinas *in vitro* de células CD34<sup>+</sup> por 14 días, determina que las células pueden progresar en diferentes fases de proliferación; por ejemplo: células que responden a las citocinas y por lo tanto proliferan; células que se dividen hasta tres veces en los primeros 7 días de cultivo y células que se dividen hasta 5 y 6 veces respectivamente hasta el final del cultivo, equivalente a 14 días. No obstante, algunas células detectadas en el cultivo inicial, se mantienen como una población distinta que se encuentra en fases G0/G1, incapaces de proliferar, a pesar de la naturaleza del segundo estímulo en el día 7 (Laddet al., 1997). Lo que nos hace suponer que en nuestro modelo de trabajo existe una fracción celular que se encuentra inmersa en la población que se mantiene en el cultivo y que después de cada enriquecimiento en los días 7, 14 y 21 de cultivo se separan de la población total que funcionalmente esta comprometida hacia un linaje en particular.

Se ha visto que del 96% de las células CD34<sup>+</sup> derivadas de la SCU que se encuentran en la fase G0/G1, 68% se encuentran en la fase G0 del ciclo celular, lo que favorece rápidamente un incremento significativo en la proporción de las células en la fase S luego de 24 hrs de la presencia citocinas (Rosti et al., 2000); un porcentaje importante de la población y que bien podría relacionarse con el tiempo que tarda en detectarse esta fase en la SCU. A este respecto se sabe que el éxito de las CPH que se encuentran en la fase G0 del ciclo celular en respuesta a la estimulación de citocinas, es un paso limitante en la expansión *ex vivo*, ya que se ha demostrado que las células CD34<sup>+</sup> separadas en las diferentes fases del ciclo celular, comparadas y caracterizadas mediante el estímulo con citocinas, algunas tienen un retraso en la respuesta proliferativa durante los primeros 7 días de cultivo y luego de otro estímulo de 7 días, se ha observado que aquellas que se mantuvieron quiescentes y no responden después de un periodo inicial de 7 días, mantienen su alta capacidad proliferativa y de CFC, y las que completan ciclos sucesivos de división disminuyen su capacidad proliferativa y la función de CFC.

Finalmente, se ha detectado una fracción celular que es capaz de mantener la supervivencia sin dividirse (Gothot et al., 1998). Con respecto a esto, se ha visto por ejemplo, que las células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> de MO son mucho más refractarias a la

activación del ciclo celular, y requieren al menos 72 hrs para mostrar niveles significativos de inducción a la proliferación (Jordan et al., 1996). Por lo que podemos sugerir que al menos en lo detectado en la progresión del ciclo celular de las CTH y las CPH de SCU y SPM, se presentan diversos eventos moleculares enfocados a la transcripción, y en donde vemos que las células se encuentran ciclando continuamente a una tasa relativamente baja o entran y salen del ciclo celular. Todo esto asociado con cambios en el fenotipo funcional en el que podemos incluir y extrapolar en un trasplante, alteraciones reversibles en la capacidad de injerto, expresión de moléculas de adhesión, receptores de citocinas, número de células progenitoras y particularmente las moléculas reguladoras de ciclo celular entre otras.

### **Reguladores del ciclo celular.**

Ahora bien, siguiendo con la expresión de algunos de los elementos clave que llevan a cabo la regulación del ciclo celular, durante los primeros siete días de cultivo, pudimos ver el nivel de expresión de p16, en SCU, y así como en el control, las células en presencia de citocinas, no presentan variación en el IFM ni en el porcentaje de expresión de p16 hasta 90 hrs de cultivo. No obstante si se pudo ver en éste último parámetro, que así como en las células de SCU, en las de SPM, se presentó un comportamiento parecido al visto en la progresión del ciclo celular. En donde desde el inicio del cultivo, el alto porcentaje de la población que expresa la proteína p16, se mantiene constante durante las primeras 24 hrs, para posteriormente disminuir, y secuencialmente ir incrementando hasta alcanzar porcentajes que llegan a casi el 80% de expresión, como lo visto en el momento de obtener la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>.

En el caso de la SPM, éste porcentaje disminuye paulatinamente conforme se incrementa el tiempo de cultivo y mantiene la misma tendencia que las células provenientes de SCU.

Resulta interesante ver cómo este patrón de expresión también podría tener una correlación directa con la progresión del ciclo celular; sin embargo aparentemente existe una mayor participación de p16 en SCU que en SPM, esto

debido a los porcentajes de expresión observados con respecto al control. Estos niveles bajos de expresión durante las primeras hrs, podrían indicar, que que este nivel de expresión pudiera ser suficiente para mantener un nivel de proliferación constante; ya que de igual manera, se ha reportado que la falta de activación de p15 y p16 está relacionada con las células en cultivo, en donde este nivel de inactivación es muy alto, comparado con los del tejido fresco; y además se ha visto que p16 es considerada como una molécula que disminuye durante el proceso de proliferación celular (Furukawa et al., 2002). Aunque también se ha demostrado en células leucémicas U937, que la expresión constitutiva de p16 induce una disminución de la proliferación pero no favorece la diferenciación, por lo que se sugiere que la progresión del ciclo celular y la diferenciación son procesos regulados de forma independiente a través de p16 (Bergh et al., 2001).

A este respecto, es interesante mencionar como al evaluar la IFM emitida por las células, el enfoque de lo observado en cuanto al porcentaje de expresión en el D0 puede mantenerse como en el caso de p21, o cambiar como en el caso de p16 y p27, en donde sólo en la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SPM, existe una IFM alta con respecto a la detectada en las de SCU. Esto podría indicar que en el caso de SPM, el número de moléculas requeridas por célula para mantener la quiescencia es mayor, a diferencia de las de SCU, y en el caso de p27, la fluorescencia emitida no es determinante para mantener tal evento celular, o bien, que este nivel de expresión pudiera tener como resultado un evento de diferenciación, sólo en una población muy pequeña; ya que al ver los porcentajes de expresión, nuestros resultados indican que pocas células expresan la molécula reguladora p27. No obstante, durante los primeros 7 días de cultivo, se pudo detectar que en el caso de las células de SCU, en cuanto a IFM, se presentan picos de expresión muy marcados que de alguna manera correlacionan con los picos de quiescencia observados en cuanto a la progresión del ciclo celular, y que de igual manera, luego de aproximadamente 5 días de cultivo, la expresión disminuye y se mantiene constante casi al final del cultivo.

Sin embargo, al evaluar el porcentaje de expresión de la población que es positiva a p27, es muy bajo, mismo que se incrementa hasta más del 45%; no

obstante, luego de 24 hrs, ésta expresión se reduce llegando a niveles apenas detectables y se mantiene así a lo largo de todo el cultivo. En el caso de las células de SPM, se detectó un nivel de expresión en términos del porcentaje, parecido al de las células de SCU, sin embargo en el caso de la IFM, si se presentaron diferencias, ya que en este caso la expresión es constante prácticamente durante todo el tiempo del cultivo, sin ningún pico de expresión como lo visto en SCU.

Otra característica importante que pudimos detectar en las células de la SCU y que se puede correlacionar en este punto, es la estequiometría que se maneja en el nivel de expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular, en donde existe una relación 1:1, y en el caso de los CDKI, estos dominan en cuanto a su función cuando están presentes con respecto a las ciclinas o CDKs, lo que podría sugerir que pocas moléculas de tales reguladores podrían ser suficientes para llevar a cabo su función. O bien, que pudieran estar llevando a cabo funciones redundantes, en donde la ausencia de una molécula puede ser sustituida por la presencia de otra molécula (Malumbres y Barbacid 2005). Además, se sabe que es importante la participación de otras moléculas que favorecen dichos eventos, tal es el caso del factor de transcripción c-Myb, que participa en eventos de proliferación y diferenciación hematopoyética, y que puede estar inhibido por el complejo formado por la Ciclina D-CDK4/CDK6 y los inhibidores p16, p21 o p27, lo que sugiere que la función de c-Myb es regulada directamente por la ciclina y la CDK en la progresión del ciclo celular en las células hematopoyéticas (Ley, 2005).

Aunque también se sabe que en las células leucémicas K562, cuando se sobre-expresa p21 y p27, sólo p27 puede inhibir la actividad de la CDK2, a pesar de que ambas puedan inhibir a la misma molécula, y que además cada una de éstas puede promover la diferenciación por diversas vías, ya que p21 activa la maduración de megacariocitos, y p27 en la expresión de marcadores de eritrocitos. Lo que demuestra distintas funciones de los inhibidores en la regulación y en la diferenciación del ciclo celular, y cómo estas dos moléculas a pesar de ser muy relacionadas, poseen actividades biológicas únicas (Munoz-

Alonso et al., 2005). No obstante, Walkley menciona que p27 favorece la autorrenovación y la diferenciación de las CTH en combinación con el antagonista de myc, mad1 de forma dependiente (Walkley, 2005).

Por lo que los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas tales como p27 pueden favorecer el proceso de diferenciación celular a través del arresto del ciclo celular, en el cual las células progenitoras hematopoyéticas se diferencian y expresan distintos marcadores específicos de linaje; por ejemplo, en el caso de células promielocíticas, se lleva a cabo un proceso de diferenciación temprana con la expresión del CD11 luego de 24 hrs de cultivo; además, resulta interesante ver que no se bloquea la progresión del ciclo celular, y que las células llevan a cabo su proceso de diferenciación hacia linaje macrofágico sin la participación de p27 (Liu et al., 1999).

En el caso de p21, en SCU, en términos de IFM y % de expresión, se ve como se mantiene la misma tendencia que la observada en la progresión del ciclo celular, ya que durante las primeras 24 hrs, un alto porcentaje de la población se encuentra en las fases G0/G1 del ciclo celular y posterior a este tiempo se reduce la quiescencia, e inicia el tránsito de éstas a través del ciclo celular y luego de aproximadamente 96 hrs de cultivo, se mantiene una quiescencia constante y que perdura hasta el final del ensayo (168 hrs). Es importante comentar, que aunque el porcentaje de expresión de p21 es relativamente bajo, este podría ser compensado por la expresión de p16, el cual mantiene el mismo patrón que p21 y de igual manera correlaciona con la progresión del ciclo celular, y en conjunto mantener los tiempos de quiescencia detectados y que pueden ser distinguidos entre uno y otro ciclo celular.

De manera similar, se pudo observar cómo en el caso de la SPM, se presenta el mismo patrón de expresión que en SCU, sin embargo, en SPM, el porcentaje de expresión de p21 baja repentinamente a las 12 hrs de cultivo y luego de esto se mantiene constante por aproximadamente tres días, disminuye a porcentajes apenas detectables a las 48 hrs y luego se incrementa y mantiene con un porcentaje de la población mayor al 50%, el cual continúa hasta el final del experimento. En lo que respecta a la IFM, ésta se mantiene constante y de forma

muy parecida a la observada en SCU; este dato es interesante, ya que al parecer lo que aquí podemos ver, es cómo el nivel de expresión de este regulador mantiene una expresión parecida en ambos modelos de estudio, lo cual por un lado habla de cómo esta molécula puede controlar a la población en un nivel de proliferación relativamente constante, pero que sin embargo se encuentra sobre-expresado en la fase G0/G1, en la que podrían también estar involucradas.

Sin embargo, con los ensayos realizados en este estudio, sólo aportan información acerca de la presencia o ausencia de tales moléculas, por lo que a este nivel, no se podría saber si efectivamente, se está llevando a cabo una interacción y formación de los complejos Ciclina-CDK-INK, que pudieran estar participando en dichos eventos moleculares.

Para el caso de la CDK4, en el día cero, se detectaron niveles de expresión que no superan el 10% de la población en los dos modelos de estudio, esto podría estar muy relacionado con la quiescencia y la baja actividad metabólica en las dos poblaciones estudiadas en las primeras horas del cultivo. Por lo que si las ciclinas o las CDK no están presentes, no se podría llevar a cabo los eventos antes mencionados, y por consiguiente no se podría continuar con el tránsito a través del ciclo celular. No obstante, de acuerdo a la redundancia de las moléculas en la progresión del ciclo celular, en este caso se podría sugerir que la baja expresión o la nula participación de una podría ser sustituida por otra (Malumbres y Barbacid 2005).

Luego de cultivar las células, en términos de IFM, en la SCU, no se detectó alguna diferencia significativa en la expresión con respecto al control; pero en el caso de la SPM, la ausencia de las citocinas marca una diferencia en la expresión, ya que ésta se mantiene por arriba de aquellas que fueron cultivadas en presencia de citocinas. Evento parecido al obtenido al graficar el porcentaje de expresión, aunque sólo en el caso del porcentaje de las células de SCU durante las 24 hrs se detecta un incremento, mismo que luego de 24 hrs disminuye a porcentajes apenas detectables.

Este patrón de expresión en los dos modelos, sugiere una participación parcial en las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, a diferencia de las de SPM, y además,

que posiblemente otro miembro de la familia de CDK como la CDK6 participa en este evento. Debido a esto, la interpretación molecular relacionada con los eventos tanto de la capacidad proliferativa, así como del tiempo de progresión del ciclo celular, esta correlacionada con la expresión de los elementos reguladores del ciclo celular; y para el caso de la ciclina D3, en SCU la presencia de citocinas no afecta su nivel de expresión, esto en relación a la IFM y al % de expresión, todo con respecto al control. Sin embargo, es interesante comentar que el comportamiento en cuanto al nivel de expresión sugiere una expresión cíclica de incremento y disminución en la síntesis de la proteína cada 24 hrs.

Caso contrario al observado en la SPM, en donde la presencia de las citocinas si provoca cambios, ya que se reduce la expresión en términos de la IFM, pero en términos del porcentaje de expresión, ésta se mantiene igual, lo cual sugiere que no sería necesaria la participación de la ciclina D3, y ésta podría ser sustituida por la ciclina D tipo 1 ó 2, aunque luego de 120 hrs de cultivo, se detecta un súbito incremento en el nivel de expresión, el cual también podría tener una correlación importante con la progresión del ciclo celular, en donde a este tiempo ya no existe una definición clara en cuanto a las diferentes fases del ciclo celular, pero si una constante en las fases G0/G1 y la fase S.

Respecto a lo anterior, se sabe que durante la diferenciación eritroide de células CD34<sup>+</sup> de SCU, luego de 7 días de cultivo, durante el proceso de proliferación se incrementa la expresión de la ciclina D3. No obstante, en la diferenciación terminal, ésta expresión disminuye y además se ha observado un inusual perfil de ciclo celular, ya que la gran mayoría de las células se encuentran en la fase S (70%) y una minoría se detecta en la fase G0/G1 (27%) (Dai, 2000). Esto sugiere que en nuestro modelo, y de acuerdo a la progresión del ciclo celular, este evento podría estar enmascarado dentro de toda la población, ya que al parecer y de acuerdo al % de expresión y a la IFM, en SCU, este evento sería muy similar; pero en SPM al parecer, éste evento, no sería regulado por la ciclina D3.

## VII. Conclusiones

1.- Las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU y SPM, se encuentran en altos porcentajes de las fases G0/G1 del ciclo celular.

2.- La quiescencia observada esta directamente relacionada con un alto porcentaje de expresión de p16 y p21 en SCU como en SPM, pero además de una mayor fluorescencia emitida de p16 y p27 en SPM.

3.- La presencia de una combinación de citocinas induce el tránsito del ciclo celular y una mayor respuesta en subpoblación enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU, lo que da como resultado que a 33 h de cultivo en promedio, se presente el primer tiempo de doblaje con aproximadamente 7 y 9 ciclos y de 45 h para SPM con 5 y 7 ciclos respectivamente. Lo que refleja el alto potencial proliferativo y de expansión de las células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU observado los primeros días de cultivo, a diferencia de SPM.

4.- Se detectó que un bajo porcentaje de la población de células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> en SCU, que p27 se expresa de forma cíclica durante los primeros 7 días del cultivo, lo cual correlaciona con los puntos de quiescencia observados en la progresión del ciclo celular.

5.- Durante el cultivo, un alto porcentaje de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU expresa de forma constante las moléculas p16, p21 y la ciclina D3.



## VIII. Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran diferencias importantes en cuanto al potencial proliferativo de la población enriquecida en células CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> de SCU y SPM, como lo ya descrito por otros trabajos y el generado por nuestro grupo de trabajo, mismo que esta muy relacionado con el número de ciclos detectados durante los primeros 7 días de cultivo. Asimismo, se observaron algunas de diferencias en cuanto a los niveles de expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular analizadas. No obstante, en este estudio, se hizo énfasis particular en los eventos relacionados a la transición de las fases G0/G1 a S; por lo que sería importante evaluar otros elementos moleculares que participan en las diferentes fases de la progresión de ciclo celular, como serían las Ciclinas D1 y D2, E, A y B de las fases G1 tardía, S y G2/M, así como las CDK faltantes y los respectivos reguladores del ciclo celular. Esto en conjunto con factores de transcripción como la proteína del retinoblastoma (Rb), los miembros de la familia de E2F, proto-oncogenes como c-myc o p53, los cuales también son pieza clave en los eventos de la progresión del ciclo celular y que de manera directa o indirecta participan en el nivel de expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular.

Por otro lado, es necesario remarcar, que este es un estudio descriptivo, que aborda el transito del ciclo celular y de algunos de sus elementos moleculares participantes en este proceso, y que únicamente implica los niveles de expresión de dichas moléculas, con especial atención en los primeros 7 días de cultivo. Sin embargo, es necesario realizar estudios funcionales, los cuales podrían aportar información valiosa acerca de las interacciones moleculares y los estados de fosforilación generados a través de las diferentes moléculas relacionadas en dicho evento y que podrían actuar diferencialmente, dependiendo de las condiciones del medio.

Asimismo, sería interesante trabajar con una población más pura, ya que aunque la población con la que se esta trabajando es una población de células troncales y progenitoras, es una población enriquecida a no más del 75% lo que

indica, que la población se encuentra en un diferente estado de activación en cuanto términos de la progresión del ciclo celular. Por lo que después de enriquecer la población CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> y con la ayuda del citómetro de flujo, sería conveniente separar a la población en la fase G0 y G1; esto podría aportarnos información más exacta acerca del comportamiento de la población celular, así como de la participación de dichos elementos moleculares, en donde de acuerdo a las condiciones de cultivo generadas en nuestro laboratorio logramos incrementar los potenciales de proliferación y expansión.

De igual forma sería interesante realizar cultivos *in vitro* en presencia de estroma, esto con el objeto de determinar si en algún momento del cultivo, las células que llegan a adherirse a éste logran regresar a un estado de quiescencia, y poder demostrar si las adhesión permite nuevamente la expresión del antígeno CD34 en la membrana y que éstas pudieran mantenerse quiescentes por tiempo indefinido, con la participación de algunas de las moléculas reguladoras del ciclo celular como p21, o la presencia del receptor del TGF- $\beta$  así como de su ligando, lo cual de alguna forma podría extrapolar lo detectado durante el trasplante y cómo estas se comportan en un tiempo indefinido *in vitro*.

## REFERENCIAS

**Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE.** Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 1985; 318:665-667.

**Aiuti A, Webb IJ, Bleul C.** The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997; 185:111-120.

**Akoulitchev S, Chuikov S, Reinberg D.** TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 2000; 407:102-106.

**Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing, Inc. New York USA 1994.

**Aleemet E, Kiyokawa H, Kaldis P.** Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol* 2005; 7:831-836.

**Alexander WS.** Cytokines in hematopoiesis. *Int Rev Immunol* 1998; 16:651-682.

**Altmann SW, Kastelein RA.** Rational design of a mouse granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor antagonist. *J Biol Chem* 1995; 270:2233-2240.

**Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, March CJ, Boswell HS, Gimpel SD, y Cosman D.** Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 1990; 63:235-243.

**Aslanian A, Laquinta PJ, Verona R, Lees JA.** Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes Dev* 2004; 14:113-122.

**Astaldi GC, Janseen MC, Lansdorp P, Willems C, Zijlemaker WP, Oosterhof F.** Human endothelial culture supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas. *J Immunol* 1980; 125:1411-1414.

**Baccini V, Roy L, Vitrat N, Chagraoui H, Sabri S, Le Couedic JP, Debili N, Wenkding F, Vainchenker W.** Role of p21 (Cip1/Waf1) in cell cycle exit of endomitotic megakaryocytes. *Blood* 2001; 98:3274-3282.

**Beagley KW, Eldridge JH, Lee F, Kiyono H, Everson MP, Koopman WJ, Hirano T, Kishimoto T, McGhee JR.** Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J Exp Med* 1989; 169:2133-2148.

**Bergh G, Telleus A, Fritzon A, Kornfalt S, Johnson E, Olsson I, Gullberg U.** Forced expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16(INK4A) in leukemic U-937 cells reveals dissociation between cell cycle and differentiation. *Exp Hematol* 2001; 29:1382-1391.

**Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE.** A Newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID repopulating activity. *Nat Med* 1998; 4:1038-1045.

**Blagosklonny MV, Pardee AB.** The restriction point of cell cycle. *Cell Cycle* 2002; 2:103-110.

**Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertocello I.** Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* 1997; 25:445-453.

**Bradley JR.** TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; 214:149-160.

**Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD.** Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia* 1995; 9:1212-1218.

**Brasel K, McKenna HJ, Morrissey PJ, Charrier K, Morris AE, Lee CC, Williams DE, Lyman SD.** Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood* 1996; 88:2004-2012.

**Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA.** Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3828-3832.

**Cam H, Dynlacht BD.** Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* 2003; 3: 311-316.

**Chabannon C, Torok-Storb B.** stem cell-stroma cell interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 177:123-136.

**Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Roussel MF.** Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27<sup>kip1</sup> regulated by mitogen-activated protein kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:1091-1096.

**Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT.** Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27<sup>kip1</sup>. *Nature Med* 2000; 6:1235-1240.

**Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL.** In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:1320-1325.

**Chrysler GR.** Consent for cadaver organ and tissue donation. *J Transpl Coord* 1998; 8:72-73.

**Cohen Y, Nagler A.** Cord blood biology and transplantation. *Isr Med Assoc J* 2004; 6:39-46.

**Conget PA, Mingell JJ.** Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp Hematol* 2000; 28:382-390.

**Dai MS, Mantel CR, Xia ZB, Broxmeyer HE, Lu L.** An expansion phase precedes terminal erythroid differentiation of hematopoietic progenitor cells from cord blood in vitro and is associated with up-regulation of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2. *Blood* 2000; 96:3985-3997.

**de Wynter EA, Back D, Hart C, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG.** CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 1998; 16:387-396.

**Dick JE, Magli MC, Huszar D, Phillips RA, Bernstein A.** Introduction of a selectable gene into primitive stem cells capable of long-term reconstitution of the hematopoietic system of  $W/W^V$  mice. *Cell* 1985; 42:71-79.

Donato JL, Ko J, Kutok JL, Cheng T, Shirakawa T, Mao XQ, Beach D, Scadden DT, Sayegh MH, Adra CN. Human HTm4 is a hematopoietic cell cycle regulator. *J Clin Invest* 2002; 109:51-8.

**Dooley DC, Oppenlander RK.** Phenotypic and functional analyses of CD34NEG hematopoietic precursors from mobilized peripheral blood. *Methods Mol Biol.* 2004; 263:201-218.

**Dorshkind K.** Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:111-137.

**Durand B, Gao FB, Raff M.** Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J* 1997; 16:306-317.

**Dyson, N.** The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998; 12:2245-2262.

**Dzierzak E, Medvinsky A, Bruijn M.** Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunol Today* 1998; 19:228-235.

**Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J.** The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev* 2005; 205:147-157.

**Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MA.** Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 1997; 90:182-193.

**Evans T, Rosenthal ET, Younglom J, Distel D, Hunt T.** Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983; 33:389-396.

**Feng XH, Lin X, Derinck R.** Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15 (Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J* 2000; 19:5178-5193.

**Ferby I, Blazquez M, Palmer A, Eritja R, Nebreda AR.** A novel p34 (cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev* 1999; 13:2177-2189.

**Flanders KC, Kim ES, Roberts AB.** Immunohistochemical expression of Smads 1-6 in the 15-day gestation mouse embryo: signaling by BMPs and TGF-betas. *Dev Dyn* 2001; 220:141-154.

**Flores-Guzman P, Flores-Figueroa E, Martínez-Jaramillo G, Mayani H.** *In vitro* characterization of two lineage-negative CD34+ cell-enriched hematopoietic cell populations from human umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2005; 7:334-344.

**Flores-Guzman P, Gutiérrez-Rodríguez M, Mayani H.** *In vitro* proliferation, expansion and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Arch Med Res* 2002; 33:107-114.

**Flores-Guzmán P, Martínez-Jaramillo G, Montesinos JJ, Valencia I, Mayani H.** Growth kinetics of progenitor cell-enriched hematopoietic cell populations in long-term liquid cultures under continuous removal of mature cells. *Cytotherapy* 2006; 8:299-307.

**Fortunel NO, Hatzfeld JA, Monier MN, Hatzfeld A.** Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor-beta. *Oncol Res* 2003; 13:445-453.

**Fukuda S, Pelus LM.** Elevation of survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. *Cell Cycle* 2002; 1: 322-326.

**Furukawa Y, Kikuchi J, Nakamura M, Iwase S, Yamada H, Matsuda M.** Lineage specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoietic cell differentiation. *Br J Haematol* 2000; 110:663-673

**Furukawa Y.** Cell cycle control genes and hematopoietic cell differentiation. *Leuk Lymphoma*. 2002; 43:225-31.

**Garriga J, Graña X.** Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* 2004; 337, 15-23.

**Furukawa Y.** Cell cycle regulation of hematopoietic stem cells. *Hum Cell* 1998; 11:81-92

**Ghanem L, Steinman RA.** p21Waf1 inhibits granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells. *Leuk Res* 2006; 10:1285-1292.

**Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K.** Cell proliferation and cell control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004; 12:1134-1141.

**Goodell MA.** Introduction: Focus on hematology. CD34 (+) or CD34 (-): does it really matter? *Blood* 1999; 94:2545-2547.

**Gothot A, Pyatt R, McMahel J, Rice, Srour EF.** Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0/G1 phase of the cell cycle. *Blood* 1997; 90:4384-4393.

**Gothot A, Pyatt R, McMahel J, Rice S, Srour EF.** Assessment of proliferative and colony-forming capacity after successive in vitro divisions of single human CD34+ cells initially isolated in G0. *Exp Hematol* 1998; 7:562-570.

**Hamamura K, Matsuda H, Takeuchi Y.** A critical role of VLA-4 in erythropoiesis in vivo. *Blood* 1996; 87:2513-2517.

**Hunt T.** Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol* 1989; 1:268-274.

**Iizuka M, Stillma B.** Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* 1999; 274:23027-23034.

**Ishimi Y.** A DNA helicase activity is associated with a MCM4, -6 and 7 protein complex. *J Biol Chem* 1997; 272:24508-24513.

**Israels ED, Israels LG.** The Cell cycle. *Stem Cells* 2001; 19:88-91.

**Jeffrey PD, Tong L, Pavletich NP.** Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev* 2000; 14:3115-3125.

**Jordan CT, Yamasaki G, Minamoto D.** High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Exp Hematol* 1996; 24: 1347-1355.

**Kasten M, Giordano A.** Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* 2001; 20: 1832-1838.



**Kherrouche Z, De Launoit Y, Monte D.** Human E2F6 is alternatively spliced to generate multiple protein isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317:749-360.

**Kikuchi I, Furukawa Y, Iwase S, Terui Y, Nakamura M, Kitagawa S, Kitagawa M, Komatsu N, Miura Y.** Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation: Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization. *Blood* 1997; 89:3980-3990.

**Kinashi T, Springer TA.** Adhesion molecules in hematopoietic cells. *Blood Cells* 1994; 20:25-44.

**Lacey KR, Jackson PK, Stearns T.** Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2817-2822.

**Lacy ER, Wang Y, Post J, Nourse A, Webb W, Mapelli M, Musacchio A, Siuzdak G, Kriwacki RW.** Molecular basis for the specificity of p27 toward cyclin-dependent kinases that regulate cell division. *J Mol Biol* 2005; 349:764-773.

**Metcalf D, Lindeman GJ, Nicola NA.** Analysis of hematopoiesis in max 41 transgenic mice that exhibit sustained elevations of blood granulocytes and monocytes. *Blood* 1995; 85:2364-2370.

**Ladd AC, Pyatt R, Gothot A, Rice S, McMahon J, Traycoff CM, Srour EF.** Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34+ hematopoietic progenitor cells residing in G0. *Blood* 1997; 90:658-668.

**Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H.** Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993; 178:787-791.

**Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J.** Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996; 271:20608-20616.

**Lei W, Liu F, Ness SA.** Positive and negative regulation of c-Myb by cyclin D1, cyclin-dependent kinases and p27 Kip1. *Blood* 2005; 105:3855-3861.

- Lemoli RM, Tafuri A, Fortuna A, Catani L, Rondelli D, Ratta M, Tura S. Bilogicla** Characterization of CD34+ cells mobilized into peripheral blood. *Bone Marrow Transplant* 1998; Suppl 5: S47-50.
- Levin RH, Brittin GM, Freireich EJ.** Different patterns of remission in acute myelocytic leukemia. A comparison of the effects of methyl-glyoxal-bis-guanylhydrazone and 6-mercaptopurine. *Blood* 1963; 21:689-698.
- Lichterfeld M, Martin S, Burkly L.** Mobilization of CD34+ haematopoietic stem cells is associated with a functional inactivation of the integrin very late antigen 4. *Br J Haematol* 2000; 110:71-81.
- Lilja L, Johansso JU, Gromada J, Mandic SA, Fried G, Berggeren PO, Bark C.** Cyclin-dependenst kinase 5 associated with p39 promotes Munc18-1 phosphorylation and Ca(2+) dependent exocytosis. *J Biol Chem* 2004; 279:29534-29541.
- Lin Y, Benchimol S.** p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia* 1997; 11 Suppl 3: 324-326.
- Liu F, Matsuura I.** Inhibition of Smad antiproliferative function by CDK phosphorylation. *Cell Cycle* 2005; 4:63-66.
- Liu F, Poursine-Laurent J, Link DC.** Expression of the G-CSF receptor on hematopoietic progenitor cells is not required for their mobilization by G-CSF. *Blood* 2000; 95:3025-3031.
- Lolli G, Johnson LN.** CAK-cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* 2005; 4:572-577.
- Loyer P, Trembley JH, Katona R, Kidd VJ, Lahti JM.** Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signal* 2005; 17:1033-1051.
- Lund-Johansen F, Houck D, Hoffman R.** Primitive human hematopoietic progenitors cells express receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 1999; 27:762-772.
- Malumbres M, Barbacid M.** Mammalia cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 2005; 30:630-641.

**Malumbres M, Barbacid M.** To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews* 2001; 1:222-231.

**Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M.** Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 2004; 118:493-504.

**Mantel C, Luo Z, Cafield J, Braun S, Deng C, Broxmeyer HE.** Involvement of p21 cip-1 and p27 kip-1 in the molecular mechanisms of steel factor-induced proliferative synergy in vitro and of p21 cip-1 in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo. *Blood* 1996; 88:3710-3719.

**Marone M, De Ritis D, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Scambia G, Pierrelli L.** Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leuk Lymphoma*. 2002; 43:493-501.

**Marshall CJ, Thrasher AJ.** The embryonic origins of human haematopoiesis. *Br J Haematol* 2001; 112:838-850.

**Marshall MS.** Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 1995; 9:1311-1318

**Martínez-Jaramillo G, Flores-Guzmán P, Montesinos J, Quintana S, Bautista J, Sánchez-Valle E, Nambo MJ, Mayani H.** *In vitro* proliferation and expansion of hematopoietic progenitors present in mobilized peripheral blood from normal subjects and cancer patients. *Stem Cells and Dev* 2004; 13:382-389.

**Matsumura I, Ishikawa J, Nakajima K, Oritani K, Tomiyama Y, Miyagawa J, Kato T, Miyazaki H, Matsuzawa Y, Kanakura Y.** Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakarioblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21 (WAF/CIP1) by Stat5. *Mol Cell Biol*. 1997; 17:2933-2943.

**Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P.** Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res* 2003; 34:476-488.

**Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A.** Biology of the hematopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992; 49:225-233.

**Mayani H, Lansdorp PM.** Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998; 16:153-165.

- McGuckin CP, Pearce D, Forraz N, Tooze JA, Watt SM, Pettengell R.** Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *Eu J Haematol.* 2003; 71:341-350.
- Miyajima A, Ito Y, Kinoshita T.** Cytokine signaling for proliferation, survival, and death in hematopoietic cells. *Int J Hematol* 1999; 69:137-146.
- Möhle R, Pförsich M, Frühauf S.** Filgrastim mobilizes more CD34+ with a different antigenic profile postchemotherapy compared with a different antigenic profile post-chemotherapy compared with treatment during steady-state hematopoiesis. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14:827-832.
- Montero-Julian FA.** The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function. *Cell Mol Biol* 2001; 47:583-597.
- Morita N, Yamamoto M, Tanizawa T.** Correlation of c-kit expression and cell cycle regulation by transforming growth factor-beta in CD34+ CD38- human bone marrow cells. *Eur J Haematol* 2003; 71:351-358.
- Morrison SJ, Wright DE, Cheshier SH, Weissman IL.** Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Curr Opin Immunol.* 1997; 9:216-221.
- Munoz-Alonzo MJ, Acosta JC, Richard C, Delgado MD, Sedivy J, Leon J.** p21Cip1 and p27Kip1 induce distinct cell cycle effects and differentiation programs in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 2005; 280:18120-18129.
- Murray A, y Hunt T.** The cell cycle. An Introduction. Oxford University Press. 1993.
- Nagata S.** G-CSF. Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Edited by Joos J. Oppenehelm & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.
- Nasheuer HP, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weissshark K.** Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002; 72:41-91.
- Nasi S, Ciarapica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L.** Making decisions through Myc. *FEBS Letters* 2001; 490:153-162.

**Nicola N.** GM-CSF. Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Edited by Joos J. Oppenheim & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.

**Ogawa M.** Changing phenotypes of hematopoietic stem cells *Exp Hematol* 2002; 30:3-6

**Ookata K, Hisanaga S, Okumura E, Kishimoto T.** Association of p34cdc2/ciclin B complex with microtubules in star fish oocytes. *J Cell Sci* 1993; 105:873-881.

**Owen M.** Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 1988 suppl 10:63-76.

**Panopoulos AD, Watowich SS.** Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine* 2008; 42:277-288.

**Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradkey A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ.** P53 independent expression of p21 Cip 1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*. 1995; 267:1024-1027.

**Parry D, Mahony D, Wills K, Lees E.** Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. *Mol Cell Biol* 1999; 19:1775-1783.

**Pei XH, Xiong Y.** Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 2005; 24:2787-2795.

**Peter M.** The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Prog Cell Cycle Res* 1997; 3:99-108.

**Pierelli L, Marone M, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Morosetti R, Rumi C, Mancuso S, Leone G, Scambia G.** Modulation of bcl-2 and p27 in human primitive proliferating hematopoietic progenitors by autocrine TGF- $\beta$ 1 is a cell cycle-independent effect and influences their hematopoietic potential. *Blood* 2000; 95:3001-3010.

**Pulendran B, Dillon S.** Flt3 Ligand. Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. 2001. AP Press. pp 899.

**Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF.** The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 2002; 100:4266-4271.

**Rafii ZS, al Nasser AA, Budair A, Tufail M.** Establishing reference total serum cholesterol values for Saudi children. *Ann Clin Biochem* 1994; 31:347-350.

**Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z.** Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 1988; 241:708-712.

**Ren S, Rollins BJ.** Cyclin/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 2004; 117:239-251.

**Rieder CL, Cole RW.** Cold-shock and the mammalian cell cycle. *Cell cycle* 2002; 1:169-175.

**Roberts M.J.** Evolving ideas about cyclins. *Cell* 1999; 98:129-132.

**Rondelli D, Raspadori D, Anasetti C, Bandini G, Re F, Arpinati M, Stanzani M, Morelli A, Baccini C, Zaccaria A, Lemoli RM, Tura S.** Alloantigen presenting capacity, T cell alloreactivity and NK function of G-CSF-mobilized peripheral blood cells. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22:631-637.

**Rosedaal M, Adam J.** Haemopoiesis by clonal succession? *Blood Cells* 1984; 10:473-485.

**Rösel M, Khaldoyanidi S, Zawadzki V, Zöller M.** Involvement of CD44 variant isoform v10 in progenitor cell adhesion and maturation. *Exp Hematol* 1999; 27:698-711.

**Rosti V, Malabarba L, Ramajoli I, Casula S, Bergamaschi G, Danova M, Invernizzi R, Pecci A, Salvaneschi L, Cazzola M.** Cord blood-derived hematopoietic progenitor cells: in vitro response to hematopoietic growth factors and their recruitment into the S-phase of the cell cycle. *Haematologica* 2000; Suppl: 18-25.

**Roy-Keller J, Linnekin D.** Stem Cell Factor. *Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense.* Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. 2001. AP Press. pp899.

**Sanchez I, Dylcht BC.** New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16:311-321.

**Schareder J.** IL-3. Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. 2001. AP Press. pp 899.

**Serr CJ, Roberts JM.** Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9:1149-1163.

**Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM.** Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells and maintains progenitor cells *in vitro*. *Blood* 1996; 87:3563-3570.

**Spivak JL.** Erythropoietin use and abuse: When physiology and pharmacology collide. *Adv Exp Med Biol* 2001; 502:207-224.

**Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, el-Houseini ME.** Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 1994, 11:3389-3396.

**Steinman RA, Huang J, Yaroslavskiy B, Goff JP, Ball ED, Nguyen A.** Regulation of p21 (WAF1) expression during normal myeloid differentiation. *Blood* 1998; 91: 4531-4542.

**Steinman RA, Yaroslavskiy B, Goff JP, Alber SM, Watkins S.** Cdk-inhibitors and exit from quiescence in primitive haematopoietic cell subsets. *Br. J. Haematol.* 2004; 3:358-365.

**Stepanova L, Sorrentino BP.** A limited role for p16<sup>Ink4a</sup> y p<sup>19Arf</sup> in the loss hematopoietic stem cells. *Blood* 2005; 106:827-832.

**Summers YJ, Heyworth CM, Wynter EA, Chang J, Testa NG.** Cord blood Go CD34<sup>+</sup> cells have a thousand-fold higher capacity for generating progenitors *in vitro* than G1 CD34<sup>+</sup> cells. *Stem Cells* 2001; 19:505-513.

**Szilvassy SJ.** The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003; 34:446-460.

**Takagi M.** Cell processing engineering for ex-vivo expansion of hematopoietic cells. *J Biosci Bioeng* 2005; 99:189-196.

**Tamir A, Petrocelli T, Stetler K, Chu W, Howard J, Croix BS, Slingerland J, Ben-David Y.** Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the

activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: a role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest. *Cell Growth Differentiation* 2000; 11:269-277.

**Tanavde VM, Malehorn MT, Lumkul R, Gao Z, Wingard J, Garrett ES, Civin.** Human stem-progenitor cells from neonatal cord blood have greater hematopoietic expansion capacity than those from mobilized adult blood. *Exp Hematol.* 2002; 30:816-823.

**Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N, Uchimaru K, Asano S, Fujita T, Nakahata T, Motukura T.** Expression of p21 (Cip1/Waf1/Sdi1) and p27 (kip) cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* 1999; 93:4167-4178.

**Teofili L, Morosetti R, Martini M, Urbano R, Putzulu R, Rutella S, Pierelli L, Leone G, Larocca LM.** Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p15(INK4B) during normal and leukemic myeloid differentiation. *Exp Hematol* 2000; 28:519-526.

**Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG.** The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; 24:4876-4882.

**Thullberg M, Bartkota J, Khan S, Hansen K, Ronnstrand L, Lukas J, Strauss M, Bartek J.** Distinct versus redundant properties among members of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors. *FEBS Lett* 2000; 470:161-166.

**Torok-Storb B.** Cellular interactions. *Blood.* 1988; 72:373-385.

**Traycoff CM, Orazi A, Ladd AC, Rice S, McMahel J, Srouf EF.** Proliferation-induced decline primitive hematopoietic progenitor cell activity is coupled with an increase in apoptosis of ex vivo expanded CD34+ cells. *Exp Hematol* 1998; 26: 53-62.

**Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, Clapp DW, Hoffman R, Law P, Srouf EF.** Human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells: are they the same as their adult bone marrow counterparts? *Blood Cells* 1994; 20: 382-390.

**Traycoff CM, Abboud MR, Laver J.** Rapid exit from G0/G1 phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34+ cells and enhanced ex vivo expansion potential. *Exp Hematol* 1994; 22:1264-1272.



**Traycoff CM, Kosak ST, Grigsby S, Srour EF.** Evaluation of ex vivo expansion potential of cord blood and bone marrow hematopoietic progenitor cells using cell tracking and limiting dilution analysis. *Blood* 1995; 85: 2059-2068.

**Trimarchi JM, Lees JA,** Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:11-20.

**Tsai KY, HY, Macleof KF, Crowley DY, Yamasaki L, Jacks T.** Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol Cell* 1998; 2:293-304.

**Tse W, Laughlin MJ.** Umbilical cord blood transplantation: a new alternative option. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:377-383.

**Uchida N, He D, Frieri AM, Reitsma M, Sasaki D, Chen B, Tsukamoto A.** The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood* 1997; 89: 465-472.

**Uchimar K, Taniguchi T, Yoshikawa M, Fujinuma H, Fujita T, Motokura T.** Growth arrest associated with 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced hematopoietic differentiation with a defective retinoblastoma tumor suppressor-mediated pathway. *Leukemia Research* 1998; 22:413-420.

**U-pratya Y, Boonmoh S, Promsuwicha O, Theerapitayanon C, Kalanchai L, Chanjerboon V, Sirimai K, Visuthhisakchai S, Bejrachandra S, Issaragrisil S.** Collection and processing of umbilical cord blood for cryopreservation. *J Med Assoc Thai* 2003; 86:1055-1062.

**Verfaillie CM, Almeida-Porada G, Wissink S, Zanjani ED.** Kinetics of engraftment of CD34(-) and CD34(+) cells from mobilized blood differs from that of CD34(-) and CD34(+) cells from bone marrow. *Exp Hematol* 2000; 28:1071-1079.

**Verfaillie CM.** Soluble factor (s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. *Blood* 1993; 82: 2045-2053.

**Volpi I, Perruccio K, Tosti A, Capanni M, Ruggeri L, Posati S, Aversa F, Tabilio A, Romani L, Martelli MF, Velardi A.** Postgrafting administration of

granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants. *Blood* 2001; 97:2514-2521.

**Walkley CR, Fero ML, Chien WM, Purton LE, McArthur GA.** Negative cell-cycle regulators cooperatively control self-renewal and differentiation of haematopoietic. *Nat Cell Biol* 2005. 2:172-178.

**Watt SM, Chan JY.** Adhesion receptors on haematopoietic progenitors cells. *Brit J Haematol* 2001; 112:541-557.

**Weissman IL.** Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100:157-168.

**Wendling F.** Trombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production. *Haematologica* 1999; 84:158-166.

**Whetton AD, Graham GJ.** Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol* 1999; 9:233-238.

**Yan F, Collector MI, Tyszko S, Sharkis SJ.** Using divisional history to measure hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Exp Hematol* 2003;31:56-64.

**Yaroslavskiy B, Watkins S, Doneberg AD, Patto TJ, Steinman RA.** Subcellular and cell-cycle expression profiles of CDK-inhibitors in normal differentiating myeloid cells. *Blood* 1999; 93:2907-2917.

**Yu H, Yuan Y, Shen H, Cheng T.** Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18INK4C and p21/Cip1/Waf1 in opposite manners. *Blood* 2006; 3:1200-1206.

**Zeng YX, e-Deiry WS.** Regulation of p21 WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 1996; 12:1557-1564.

**Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG.** What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7:835-842.

**Zhang E, Li X, Zhang S, Chen L, Zheng X.** **Cell cycle synchronization of embryonic stem cells:** Effect of serum deprivation on the differentiation of embryonic bodies in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 33: 1171-1177.

**Zhang L, Gjoerup O, Roberts TM.** Serine/threonine kinase cyclin G-associated kinase regulates epidermal growth factor receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:10296-10301.

**Zhang W, Grasso L, McClain CD, Gambel AM, Cha Y, Travali S, Deisseroth AB, Mercer WE.** p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation *Cancer Res* 1995; 55:668-674.

**Zhao J, Kennedy BK, Lawrence BD, Barbie DA, Matera AG, Fletcher JA, Harlow E.** NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene. *Genes Dev* 2000; 14:2283-2297.

## Original Research Report

# Cell Cycle Differences In Vitro Between Primitive Hematopoietic Cell Populations from Adult and Umbilical Cord Blood

ANTONIO ALVARADO-MORENO,<sup>1</sup> ANTONIETA CHÁVEZ-GONZÁLEZ,<sup>1</sup>  
ARTURO CÉRBULO,<sup>2</sup> LOURDES ARRIAGA,<sup>3</sup> and HECTOR MAYANI<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Lineage-negative ( $\text{Lin}^-$ ) cell populations, obtained by negative selection from umbilical cord blood (UCB) and adult mobilized peripheral blood (aMPB), were cultured in serum-free liquid cultures supplemented with a mixture of seven stimulatory cytokines. On specific days, proliferation potential was assessed and cell cycle status was determined by DNA content. Expression of the cell cycle regulators cyclin D3 (cD3), cyclin-dependent kinase 4 (cdk4), p21<sup>cip1/waf1</sup> (p21), and p27<sup>kip1</sup> (p27) was also determined. As expected, UCB cells showed significantly higher proliferation potentials than aMPB cells, particularly during the first 7 days of culture. During this period of time, higher numbers of cell cycles were observed in UCB cells (7–9 cycles), as compared to aMPB cells (5–6 cycles). Higher levels of cD3, cdk4, and p27 were also detected in UCB cells. Our results confirm that UCB cells possess an intrinsically higher proliferation potential, as compared to aMPB cells, and suggest that such a biological difference is due, at least in part, to differences in cell cycle status. This, in turn, seems to result from the differential expression of cell cycle regulatory molecules.**

### INTRODUCTION

**P**RIMITIVE HEMATOPOIETIC CELLS derived from umbilical cord blood (UCB) and adult mobilized peripheral blood (aMPB) possess intrinsically different biological properties (1,2). It is particularly evident that cells from newborns possess higher proliferation and expansion potentials than their adult counterparts, as demonstrated both in vivo and in vitro (3–5). Although some insights have been reported (6,7), the actual mechanisms leading to such biological differences are still not completely understood.

Recently, we have characterized a hematopoietic cell population, obtained by negative selection, which consists of lineage-negative ( $\text{Lin}^-$ ) cells, and is enriched for primitive cells, including those expressing the CD34 anti-

gen ( $\text{CD34}^+$  cells) and those capable of forming hematopoietic colonies in semisolid cultures (colony-forming cells; CFCs) (8). In keeping with the concept mentioned earlier, we have observed that, when cultured in serum-free liquid cultures in the presence of a rich cytokine cocktail, progenitor cell-enriched  $\text{Lin}^-$  cell populations derived from UCB show significantly higher in vitro growth capacities than equivalent populations from aMPB (9). The mechanisms responsible for this have not been elucidated.

It has been largely recognized that a cell reproduces by performing an orderly sequence of events, known as the cell cycle, in which it duplicates its contents and then divides in two. Such a process consists of different phases and is tightly controlled by a network of regulatory proteins, including cyclins, cyclin-dependent kinases (cdk)

<sup>1</sup>Oncology Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

<sup>2</sup>Immunology Department, National Institute of Perinatology, Mexico City, Mexico.

<sup>3</sup>Immunochemistry Research Unit, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico.

and cdk inhibitors (10,11). It is noteworthy that, although some particular conditions may exist, the cell cycle as a whole is very similar in all mammalian cells. On the basis of these concepts, it seems reasonable to suggest that the biological behavior of hematopoietic cells, that is to say, their ability to divide and differentiate, can be explained, at least in part, by changes in their cell cycle.

In trying to contribute to our understanding of the biology of circulating stem and progenitor cells, and in particular, to understand the functional differences that we have observed between newborn and adult hematopoietic cells when cultured in cytokine-supplemented liquid cultures, in the present study we have assessed the cell cycle status of primitive cell populations from UCB and aMPB, and analyzed the changes in such a cycle throughout the culture period. We have further evaluated the expression of particular cell cycle regulatory proteins (cD3, cdk4, p21, and p27) in both cell populations.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell collection*

UCB cells, collected according to institutional guidelines, were obtained from 16 normal full-term deliveries at the Troncoso Hospital (IMSS, Mexico City). These procedures have been approved by the Ethics Committee of the National Medical Center, IMSS. aMPB samples were obtained from 7 healthy adult individuals (18–41 years old; one sample per individual), participating as donors for allogeneic transplants. In all of them mobilization of hematopoietic cells into circulation was achieved by daily administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF; Filgrastim, Roche, Switzerland) at 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per day, for 6 consecutive days. aMPB harvest was performed on days 5 and 6.

### *Cell processing*

Low-density mononuclear cells (MNCs;  $<1.077 \text{ g/ml}$ ) were isolated by standard methods, using Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), as previously described (8,9).

### *Primitive cell enrichment*

Primitive,  $\text{Lin}^-$  cells, including those expressing the CD34 antigen ( $\text{CD34}^+$  cells) were enriched from MNCs by negative selection (12), using the StemSep™ system (Stem Cell Technologies Inc; STI, Vancouver, Canada), as previously described in detail (8,9). We have previously demonstrated that this selection system is effective in enriching for  $\text{CD34}^+$  cells and CFCs, and that the se-

lected cell fraction is devoid of stromal cells and the frequency of mature  $\text{Lin}^+$  cells is extremely low (8,9). In the present study  $\text{CD34}^+$  cells corresponded to 55–75% of the selected cells, whereas the frequency of CFCs was 6–12% of selected cells. No significant differences were observed between UCB and aMPB.

### *CD34<sup>+</sup> cell quantification*

On the indicated days,  $\text{CD34}^+$  cells were identified and quantified by immunocytochemistry, both before and after negative selection, as previously described (8,9).

### *Liquid cultures*

Cells obtained after negative selection were resuspended in Serum-Free Expansion Medium (StemSpan™; STI) supplemented with the following recombinant hematopoietic cytokines: thrombopoietin (TPO); Flt-3-ligand (FL); Steel factor (SF); interleukin-3 (IL-3); IL-6; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF); and G-CSF. All cytokines were obtained from STI and were added at 10 ng/ml. The whole procedure was performed as described in detail elsewhere (13).

### *Hematopoietic colony assays*

Hematopoietic progenitor cells capable of forming colonies in vitro (CFCs) were assayed in methylcellulose-based semisolid cultures (MethoCult™; STI), as described previously in detail (8,9).

### *Cell cycle analysis*

To determine each one of the cell cycle phases, we analyzed the content of DNA on cells that were either freshly obtained from blood samples or from liquid cultures. Cells were fixed in 80% ethanol (Sigma, St. Louis, MO) and resuspended in a staining solution of RNase (40 U/ml; Sigma) for 15 min. After that, cells were stained by the addition of 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  propidium iodide (PI) for 1 h. Linear fluorescence signals of PI (area and width) were assessed by flow cytometry on a Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA) by collecting a minimum of 10,000 events. Data were stored as a list mode of files for subsequent off-line analysis using MultiCycle for Windows software.

### *Expression of cell cycle regulators*

Permeabilization of cells obtained from either blood samples or liquid cultures was performed by using the IntraPrep™ Permeabilization Kit, following the manufacturer's instructions (Immunotech, Marseille, France). Permeabilized cells were incubated with the following

monoclonal antibodies (all of them from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA): anti-cd3, anti-cdk4, anti-p21, and anti-p27. Antibodies were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or rhodamine. Flow cytometry analysis was performed on a BD FACSAria (Beckton-Dickinson, San Jose, CA).

### Statistics

Statistical analysis was performed by using Student's *t*-test.

## RESULTS

### Proliferation analysis

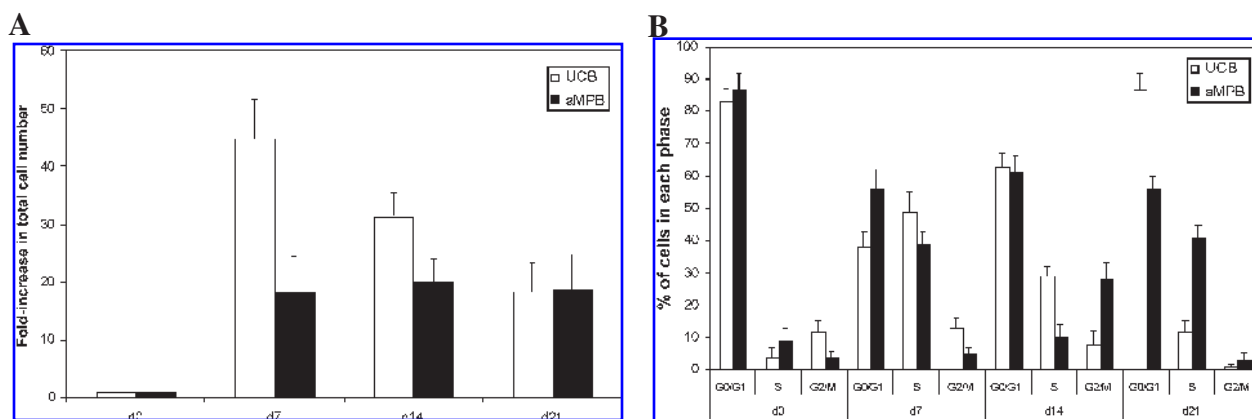
During the first 7 days of culture, the proliferation potential of UCB cell populations was significantly higher than that of their aMPB counterparts (Fig. 1A). During the following 2 weeks, the proliferation capacity of UCB cells decreased, so that the total number of cells generated from day 14 to day 21 was similar in UCB and aMPB cultures (Fig. 1A). It has to be kept in mind that newborn and adult hematopoietic populations had similar levels of both CD34<sup>+</sup> cells and CFCs at culture onset, as well as on days 7, 14, and 21 (13). Thus, confirming previous studies by our own group and others, results shown in Fig. 1A demonstrate that, as compared to aMPB cells, Lin<sup>-</sup> cell populations from UCB possess an intrinsically higher proliferation potential, which was more evident during the first week of culture.

### Cell cycle status

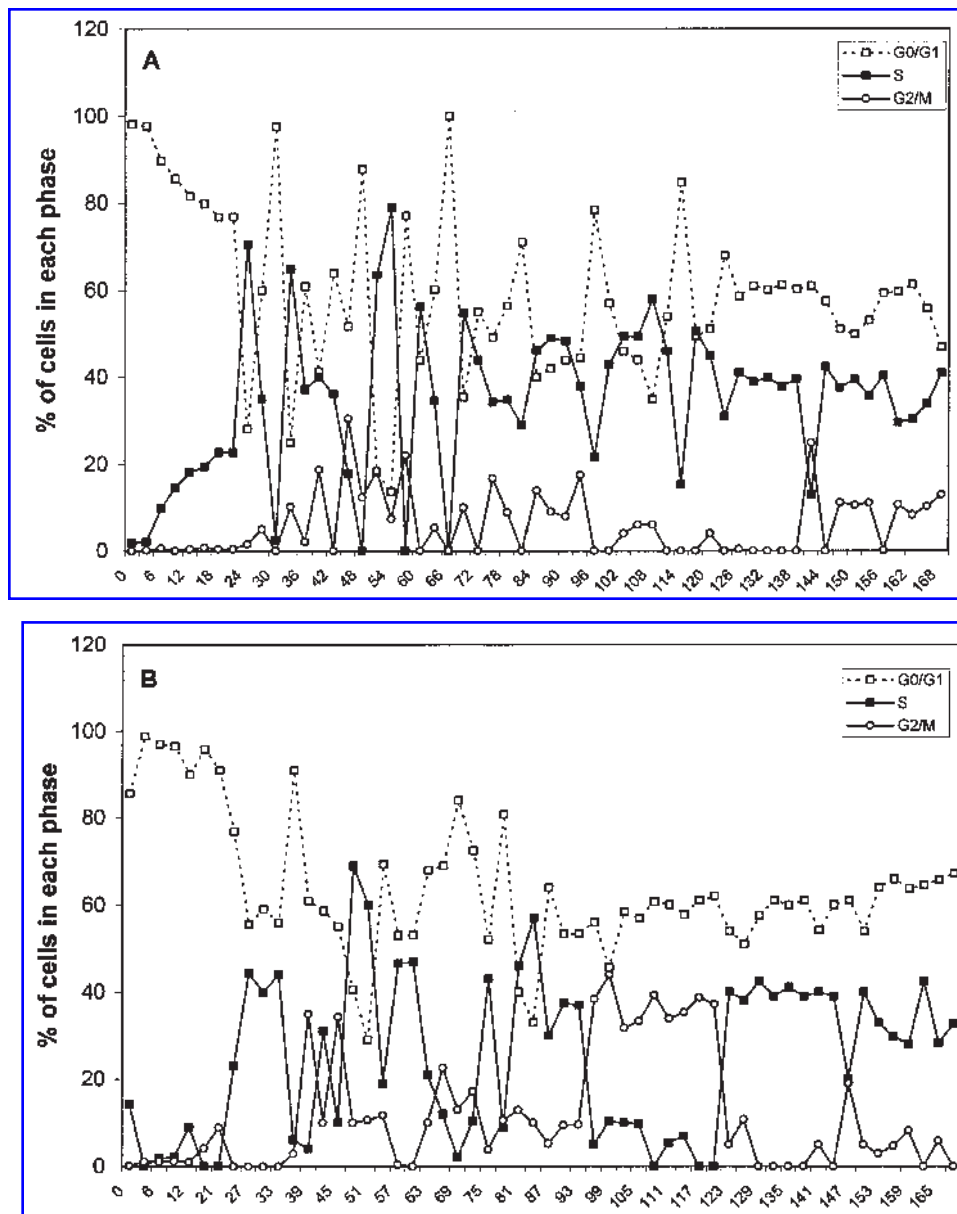
As shown in Fig. 1B, the vast majority of cells present at culture onset, both in UCB and aMPB cultures, were in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of cell cycle. During the following weeks, variable increments in the proportion of cells in S and G<sub>2</sub>/M were observed. Indeed, whereas aMPB cells showed a cyclic behavior (the proportion of cells in S phase was low on days 0 and 14, and high on days 7 and 21), UCB cells showed an initial increase in the proportion of S phase cells, on day 7, and then a continuous decline (Fig. 1B).

Because one of the major goals of the present study was to assess possible differences in cell cycle kinetics between newborn and adult hematopoietic cells, and based on the proliferation capacity shown by UCB and aMPB cells throughout the culture period, we decided to focus on the first week of culture, as it is during this period of time that the greatest differences in proliferation potential between both populations were observed. Accordingly, the cell cycle status of both cell populations was assessed during the first 7 days (168 h) of culture, at 3-h intervals.

In cultures of UCB cells, the first cell cycle was completed in about 30 h. After that, a series of cell cycles could be distinguished (based on the sequential progression of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, and G<sub>2</sub>/M), up to hour 120. It is noteworthy that such cycles were shorter than the first one, with an average length of 16 h; in fact, seven to nine cell cycles could be observed during the first 120 h (a representative experiment is shown in Fig. 2A). After this time, the proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> remained constant (50–60% of total cells) and no clear cycles could be distinguished.



**FIG. 1.** Proliferative capacity and cell cycle status of UCB and aMPB cell populations. Both cell fractions were cultured in serum-free liquid cultures supplemented with a combination of seven stimulatory cytokines. On days 0, 7, 14, and 21, Lin<sup>-</sup> cells were obtained by negative selection and cultured for 7 days, as described previously (13). Results shown represent the increase in total cell number (A) or the proportion of cells in each phase of cell cycle (B) on the indicated days of culture, and correspond to mean  $\pm$  SD of 16 (UCB) and 7 (aMPB) separate experiments. In A, the differences between UCB and aMPB cultures on days 7 and 14 were statistically significant ( $p < 0.05$ ). In B, the differences between UCB and aMPB cultures in terms of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (on day 21), S (on days 14 and 21), and G<sub>2</sub>/M (on days 0, 7 and 14), were statistically significant ( $p < 0.05$ ).



**FIG. 2.** Cell cycle status of UCB (A) and aMPB (B) cell populations, throughout the first 7 days (168 h) of culture. Results correspond to the proportion of cells in each phase of cell cycle, which were determined every 3 h. Representative experiments for UCB ( $n = 3$ ) and aMPB ( $n = 3$ ) are shown.

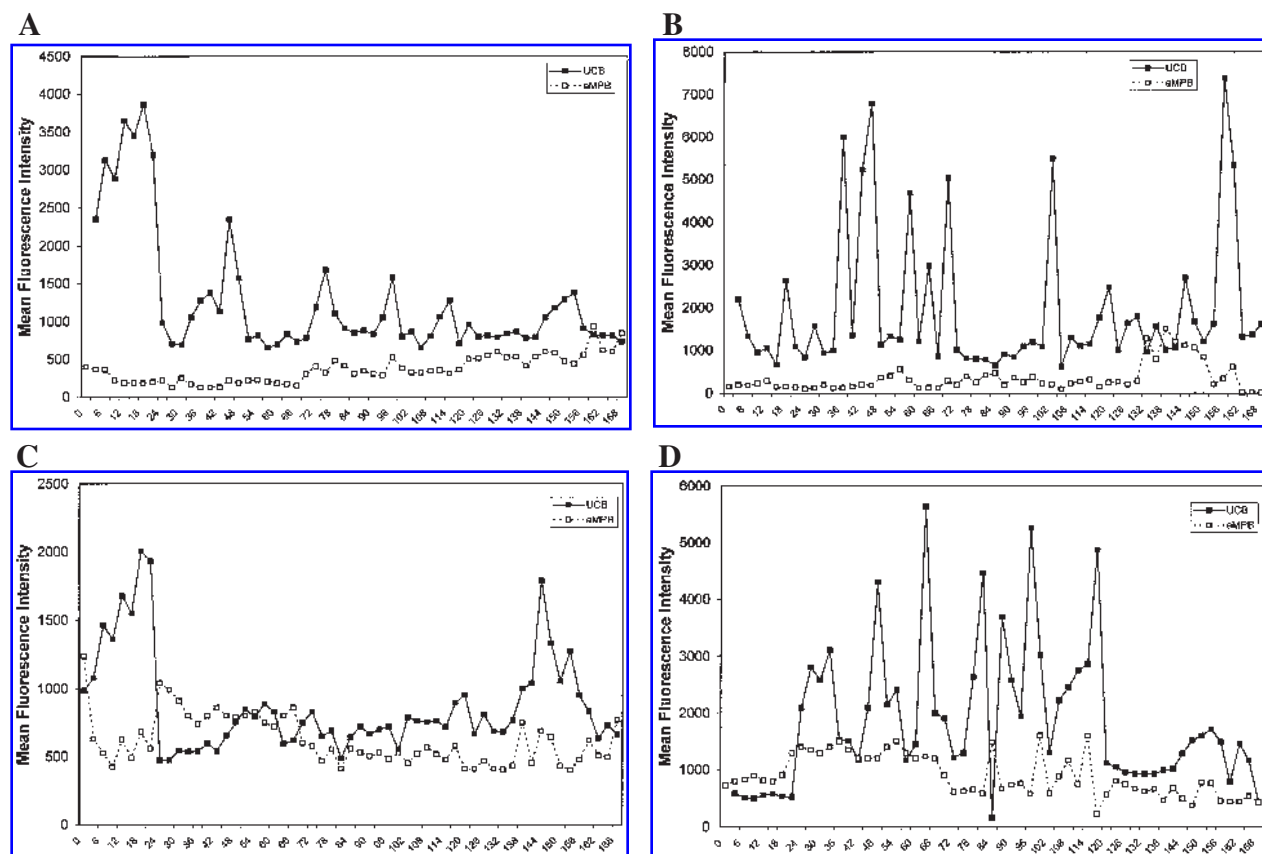
In cultures of aMPB cells, the first cell cycle was completed at around 36 h (slightly longer than in UCB cultures). This first cycle was followed by shorter cycles (14 h long, in average) that were distinguished up to hour 87. Five to six cycles could be distinguished during these 87 h (a representative experiment is shown in Fig. 2B). After this time, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cells represented 50–65% of total cells and no clear cycles could be observed.

#### *Cell cycle regulators*

We then analyzed the expression of key cell cycle regulators. As shown in Fig. 3A, during the first 20 h of cul-

ture, cD3 was present at significant levels in UCB cells. After that, there was a sharp decrease, which correlated with progression into S phase of the first cell cycle. During the following days, transient, sharp increments (peaks) were evident. In contrast, at all time points, cD3 levels in aMPB cells were low and remained relatively constant during the 7 days of analysis (Fig. 3A). In keeping with the above results, cdk4 levels in UCB cells were significantly increased, showing several peaks throughout the 7 days of culture (Fig. 3B). On the other hand, aMPB cells showed low levels of such a cdk at most time points.

In UCB cells, the cell cycle inhibitor p21 showed high levels during the first 20 h of culture, and then a sharp



**FIG. 3.** Expression of cD3 (A), cdk4 (B), p21 (C), and p27 (D) in UCB and aMPB cell populations, throughout the first 7 days (168 h) of culture. Results correspond to the levels of expression determined every 3 h. Representative experiments for UCB (black symbols;  $n = 3$ ) and aMPB (open symbols;  $n = 3$ ) are shown.

decrease in its levels was evident (Fig. 3C). For the next 120 h, p21 levels remained relatively steady, followed by a new increase to levels similar to those observed at the beginning of the culture. In aMPB cells, p21 levels were relatively low during the first 20 h of culture, in spite of being high at 0 h; thus, showing different kinetics to the one seen in UCB cells. After that, p21 levels were not too different from those in UCB cells, although no late peak could be observed (Fig. 3C).

Another member of the family of cdk inhibitors, p27, was also assessed in our culture system. As shown in Fig. 3D, the levels of this regulatory molecule were low in UCB cells during the first 24 h of culture; afterwards, a series of peaks were observed for the following 90 h. Interestingly, the drop in p27 levels observed by 120 h correlated with the time at which the proportion of cells in  $G_0/G_1$  remained constant (50–60% of total cells) and no more cell cycles could be clearly distinguished. In cultures of aMPB, the levels of p27 were usually lower than in UCB cells, except for the first 20 h, in which levels were slightly higher (Fig. 3D). Between 24 and 120 h of culture, peaks in the levels of p27 were also observed, although these were significantly smaller than those seen in UCB cultures.

## DISCUSSION

We have reasoned that the differences in proliferation and expansion capacities between hematopoietic stem/progenitor cells from neonates and adult subjects must be the result of differential expression of cell cycle regulators, and this, in turn, must lead to differences in cell cycle status. Accordingly, in the present study we have assessed the cell cycle status of primitive cell populations from UCB and aMPB, and analyzed the changes in such a cycle throughout the culture period. We have further evaluated the expression of particular cell cycle regulatory proteins in both cell populations.

Herein, we have confirmed our previous reports indicating that  $Lin^-$  cells from UCB possess intrinsically higher proliferation potentials than their adult counterparts. Our results further showed that, in keeping with our hypothesis, significant cell cycle differences exist between both cell populations. At culture onset, the vast majority of cells, both from UCB and aMPB, were in  $G_0/G_1$  phase of the cell cycle, which correlated with previous studies by different groups showing that most circulating cells are in a “resting” state (14–16). We did not determine whether those cells were in the  $G_0$  or  $G_1$  phase;



however, evidence exists that the majority of cells included within the  $G_0/G_1$  population are cycling (in  $G_1$  phase) and ready to progress into S phase under appropriate stimulation (17,18). It is noteworthy that functional differences have been described between circulating cells residing in the  $G_0$  and  $G_1$  phases of the cell cycle (16,19,20). It is also interesting that in most studies, the proportion of cells in S/ $G_2$ /M is <5% (15,18,19). In the present study, the proportion of cells in S/ $G_2$ /M was 10–15%. This discrepancy was probably due to differences in the composition of the cell populations used. That is to say, in our study, the  $Lin^-$  cell fraction obtained by negative selection consisted of  $CD34^+$  cells (55–75% of total cells) together with immature precursors (8); in contrast, in most studies the input population consisted of  $CD34^+$  cells obtained by positive selection by fluorescence-activated cell sorting (FACS).

In spite of the fact that the  $Lin^-$  cell populations studied here were heterogeneous, and there was no cycling synchronicity among the cells, clear cell cycles in the population as a whole, were evident during the first 7 days of culture. The number of such cycles in UCB cultures varied between 7 and 9, whereas in cultures of aMPB cells such a number varied between 5 and 6. This observation supports the notion that the proliferation potential of a cell population results, at least in part, from the ability of the cells within such a population to perform more cell cycles in response to specific external stimuli.

Such an ability to divide, in turn, has been shown to depend on the expression of specific cell cycle regulators (10,11). cD3 and cdk4 are molecular partners and function together, as a complex, to promote cell division and proliferation (21,22). In the present study, we observed higher levels of both molecules in cultures of UCB cells, as compared to cultures of aMPB cells. This finding indicates that whereas the cD3–cdk4 complex seems to be important for UCB cell proliferation, it may not play a key role in proliferation of aMPB. The possibility that a different cyclin–cdk complex is involved in proliferation of adult progenitors remains to be determined.

Among the cdk inhibitors that have been described, we focused on p21 and p27, because they have been shown to play important roles in hematopoiesis. Both molecules are members of the cip/kip family and function at the  $G_1$  phase targeting cdks 4, 6, and 2. It has been shown that p21 plays both, inhibitory and stimulatory roles in cell proliferation. Indeed, on the one hand, p21 is a key regulator of cell cycle arrest (23); on the other hand, this molecule may promote cell cycle progression (24). Thus, the differences observed in cultures of neonatal and adult cells may have to do with such opposing roles in cell cycle. In terms of p27, we observed high levels during the period in which cell cycles were evident, suggesting that this molecule may promote proliferation of neonatal cells.

This observation is particularly interesting considering that, although this molecule is regarded primarily as an inhibitor of cell cycle, evidence exists that p27 can be a promoter of cell cycle progression by functioning as an adaptor protein for cdk4–cyclin D complexes, which are required for proliferation (24). Furthermore, these results are in keeping with previous studies showing that p27 is expressed at high levels in populations of cells that are rapidly growing (25,26). In aMPB cultures, on the other hand, p27 levels were usually lower than in UCB cultures throughout the entire period of study. Interestingly, in our culture system, the major difference in p21 levels between UCB and adult cells was seen when no cell cycles were observed. In contrast, the major differences in the levels of p27 were observed when clear cell cycles were evident. This finding suggests that both regulators may play different roles in our culture system.

Taking together, the above observations suggest that, depending on whether the cells are derived from UCB or aMPB, cD3 and cdk-4, as well as the cdk inhibitors p21 and p27, play different roles in proliferation of hematopoietic cells. Our study, however, did not address the specific roles that each regulator plays in the whole growth process of these cell populations. Thus, further studies will be necessary to investigate the actual mechanisms by which such regulatory molecules promote and inhibit the cell cycle in primary hematopoietic cells from neonatal and adult subjects. It will also be important to address the expression and activity of other regulators of cell cycle not included in the present study.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by grant No. FP-2005/2/II/365 from the Mexican Institute of Social Security (IMSS, Mexico), and grant No. 7204 from the National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico). A. Alvarado-Moreno was the recipient of a scholarship from CONACYT, and Direccion General de Estudios de Posgrado, Fac. Medicina, UNAM.

## REFERENCES

1. Szilvassy SJ. (2003). The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34:446–460.
2. Mayani H, A Alvarado-Moreno and P Flores-Guzman. (2003). Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res* 34:476–488.
3. Broxmeyer HE, GW Douglas, G Hangoc and E Boyse. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3828–3832.
4. Lansdorp PM, W Dragowska and H Mayani. (1993). Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 178:787–791.

## CELL CYCLE STATUS OF UCB AND aMPB

5. Tanavde VM, MT Malehorn, R Lumkul, Z Gao, J Wingard, ES Garrett and CI Civin. (2002). Human stem-progenitor cells from neonatal cord blood have greater hematopoietic expansion capacity than those from mobilized adult blood. *Exp Hematol* 30:816–823.
6. Traycoff CM, MR Abboud, J Laver, DW Clapp and EF Sour. (1994). Rapid exit from G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> cells an enhanced ex vivo expansion potential. *Exp Hematol* 22:1264–1272.
7. Vaziri H, W Dragowska, RC Allsop, C Harley and PM Lansdorp. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9857–9860.
8. Flores-Guzman P, E Flores-Figueroa, G Martinez-Jaramillo and H Mayani. (2005). In vitro characterization of two lineage-negative CD34<sup>+</sup> cell-enriched hematopoietic cell populations from human UC blood. *Cytotherapy* 7:334–344.
9. Martinez-Jaramillo G, P Flores-Guzman, JJ Montesinos, et al. (2004). In vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors present in mobilized peripheral blood from normal subjects and cancer patients. *Stem Cells Dev* 13:382–389.
10. Hartwell LH and TA Weinert. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629–634.
11. Israels ED and LG Israels. (2001). The cell cycle. *Stem Cells* 19:88–91.
12. Wognum AW, EC Eaves and TE Thomas. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34:461–475.
13. Flores-Guzman P, G Martinez-Jaramillo, JJ Montesinos, I Valencia and H Mayani. (2006). Growth kinetics of progenitor cell-enriched hematopoietic cell populations in long-term liquid cultures under continuous removal of mature cells. *Cytotherapy* 8:299–307.
14. Koenig JM, B Lutttge, NA Benson and RD Christensen. (2001). Cell cycle status of CD34<sup>+</sup> cells in human fetal bone marrow. *Early Human Dev* 65:159–163.
15. Uchida N, D He, AM Frieria, et al. (1997). The unexpected G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood* 89:465–472.
16. Summers YJ, CM Heyworth, EA de Wynter, et al. (2001). Cord blood G<sub>0</sub> CD34<sup>+</sup> cells have a thousand-fold higher capacity for generating progenitors in vitro than G<sub>1</sub> CD34<sup>+</sup> cells. *Stem Cells* 19:505–513.
17. Lemoli RM, A Tafuri, A Fortuna, et al. (1997). Cycling status of CD34<sup>+</sup> cells mobilized into peripheral blood of healthy donors by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 89:1189–1196.
18. Leibundgut K, NMR Schmitz and A Hirt. (2005). Catalytic activities of G1 cyclin-dependent kinases and phosphorylation of retinoblastoma protein in mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 23:1002–1011.
19. Gothot A, R Pyatt, J McMahel, et al. (1997). Functional heterogeneity of human CD34<sup>+</sup> cells isolated in subcompartments of the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *Blood* 90:4384–4393.
20. Gothot A, J van der Loo, DW Clapp and EF Sour. (1998). Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood* 92:2641–2649.
21. Neufeld T and BA Edgar. (1998). Connections between growth and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 10:784–790.
22. Johnson DG and CL Walker. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:295–312.
23. Gartel AL, MS Serfas and AL Tyner. (1996). p21—negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 213:138–149.
24. Cheng M, P Olivier, JA Diehl, M Fero, MF Roussel, JM Roberts, et al. (1999). The p21 (Cip1) and p27 (Kip1) CDK “inhibitors” are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* 18:1571–1583.
25. Yaroslavskiy B, S Watkins, AD Donnenberg, TJ Patton and RA Steinman. (1999). Subcellular and cell-cycle expression profiles of CDK-inhibitors in normal differentiating myeloid cells. *Blood* 93:2907–2917.
26. Marone M, L Pierelli, S Mozzetti, V Masciullo, G Bonanno, R Morosetti, et al. (2000). High cyclin-dependent kinase inhibitors in Bcl-2 and Bcl-xL-expressing CD34<sup>+</sup> proliferating haematopoietic progenitors. *Br J Haematol* 110:654–662.

Address reprint requests to:

*Dr. Hector Mayani*

*National Medical Center, IMSS*

*Tallo 2, D-102, San Pablo Tepetlapa*

*Coyoacan, Mexico, D.F. 04620, Mexico*

*E-mail: hmayaniv@prodigy.net.mx*

Received October 23, 2006; accepted December 6, 2006.



# El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas

José Antonio Alvarado-Moreno y Héctor Mayani\*

Laboratorio de Hematopoyesis, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México, D.F., México

Recibido en su versión modificada: 06 de julio de 2006

Aceptado: 01 de septiembre de 2006

## RESUMEN

El ciclo celular constituye el conjunto de eventos que determinan la actividad metabólica de toda célula así como su división y la generación de células hijas. Este proceso está involucrado en todos los procesos celulares tales como proliferación y diferenciación. Se ha demostrado que diversos elementos moleculares participan en su regulación y que alteraciones en este proceso pueden conducir a trastornos fisiológicos e incluso a la muerte del organismo. En los mamíferos, uno de los tejidos con mayor recambio celular es el hematopoyético, por lo que se requiere un control muy estricto del ciclo celular, principalmente a nivel de células troncales y progenitoras para la óptima producción de células sanguíneas. En este artículo presentamos un panorama general de los principales mecanismos y factores involucrados en la regulación del ciclo celular, poniendo particular énfasis en su papel en la biología de las células hematopoyéticas primitivas.

### Palabras clave:

Ciclo celular, inhibidores del ciclo celular, hematopoyesis, células troncales, células progenitoras

## SUMMARY

The cell cycle comprises a group of biological events that determine the metabolic activity of any cell, as well as its division and the generation of new daughter cells. It is involved in every cellular process, such as proliferation and differentiation. It has been shown that several molecular elements regulate the cell cycle, and that alterations in any of its phases and/or regulators could give rise to physiologic deficiencies, and even death. In mammals, the haematopoietic tissue is one of the most active in terms of cell replacement; thus, a tight cell cycle control, particularly at the level of stem and progenitors cells is crucial for optimal blood cell production. In the present article, we give a comprehensive overview of the major mechanisms and regulatory molecules that participate in the cell cycle of mammalian cells, with particular emphasis on its role in the biology of primitive cells of the hematopoietic system.

### Keywords:

Cell cycle, inhibitors, haematopoiesis, stem cells, progenitor cells

## Introducción

En 1838, Theodor Schwann y Jacob Schleiden propusieron, mediante la teoría celular, que todos los organismos vivos se componen de una o más células que proceden de la división de células pre-existentes, con lo que afirmaban que la división celular en cierta forma es una ruta a la inmortalidad.<sup>1</sup> Las células se reproducen por la duplicación de su contenido genético y la división de su citoplasma; este ciclo de división celular es el medio fundamental por el cual todos los organismos vivientes son propagados. En especies unicelulares como las bacterias y levaduras, cada división celular produce un organismo; en organismos multicelulares, múltiples ciclos de división celular son necesarios para generar un nuevo individuo y, posteriormente, necesarios para el mantenimiento de los individuos a lo largo de toda su vida.

En los mamíferos, uno de los tejidos con mayor recambio celular y, por ende, donde la división es más común, es el tejido hematopoyético. Todas las células de la sangre se forman a partir de la continua producción de células progenitoras que, a su vez, da lugar a células maduras. Así, nuestro organismo produce  $1 \times 10^{10}$  eritrocitos y  $4 \times 10^8$  leucocitos cada hora durante la etapa adulta.

El ciclo celular es sin duda uno de los procesos biológicos más intensamente estudiados, y a pesar de los grandes esfuerzos realizados, aún quedan incógnitas de cómo éste es controlado por las diversas moléculas que participan en él. En el presente artículo, haremos un análisis de los mecanismos que regulan el ciclo celular en general y posteriormente nos enfocaremos a las características particulares del ciclo celular en el proceso de formación de las células sanguíneas.

\* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr Héctor Mayani, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720 México, D.F., México. Tel.: (52 55) 5627-6959, Fax: (52 55) 5761-0952. Correo electrónico: hmayaniv@prodigy.net.mx

## El ciclo celular

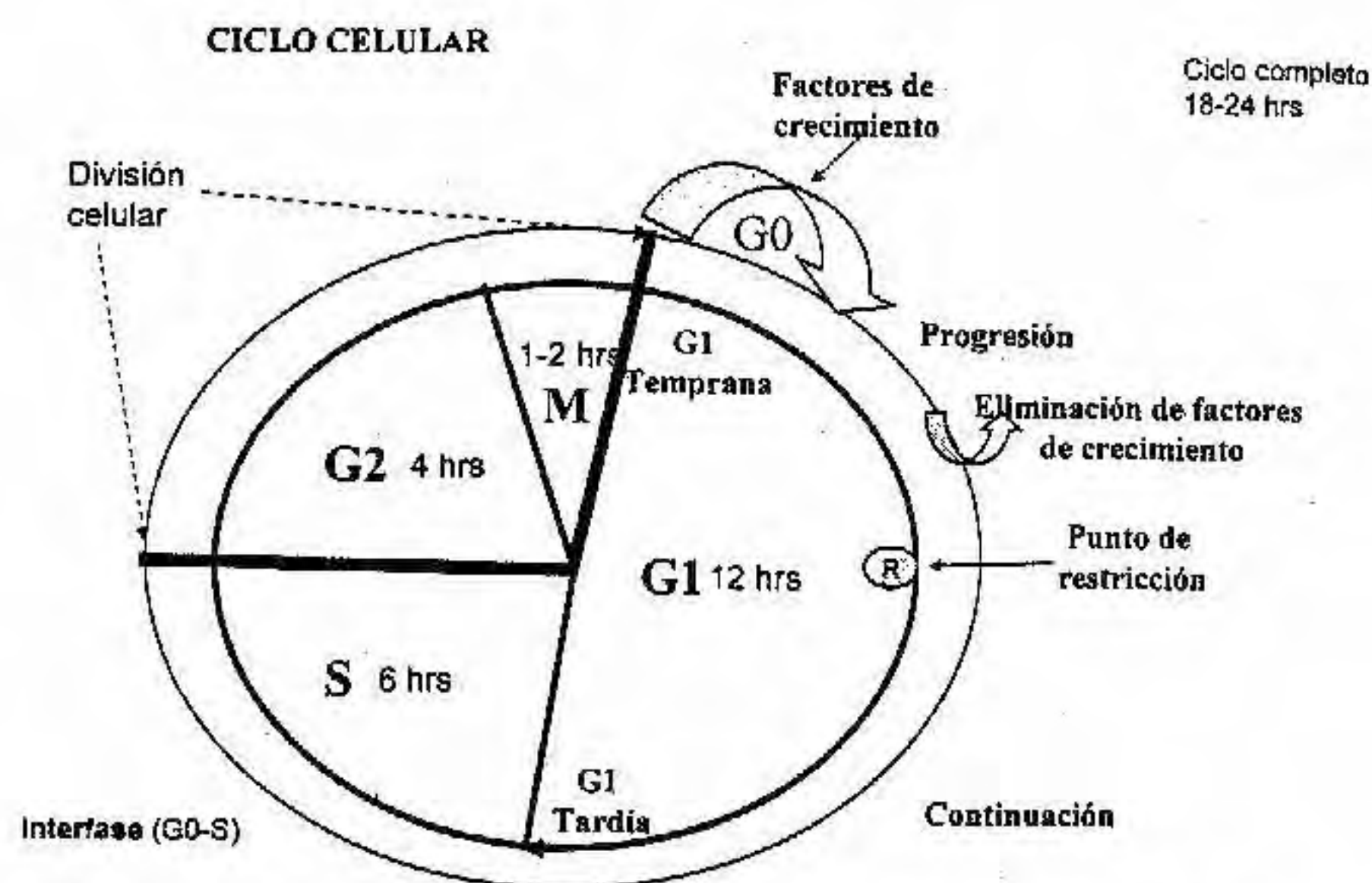
El ciclo celular es un término usado para describir una serie ordenada de eventos responsables de coordinar la duplicación del material genético y citoplásmico de una generación celular a la siguiente, y de asegurar la segregación balanceada del material genético en las dos células hijas. En células eucarióticas el ciclo celular se divide en cuatro fases basados en eventos visibles o medibles, denominadas G1, S, G2 y M. Si durante la fase G1, las células están sujetas a estimulación por mitógenos extracelulares y factores de crecimiento, transitan en esta fase para proceder con la síntesis de ADN en la fase S; G2 es el intervalo entre la culminación de la síntesis de ADN y la mitosis (M). Esta última es visible al microscopio y comprende la citocinesis (división del contenido citoplásmico) y la cariocinesis (división del contenido cromosómico celular). Existe también un estadio denominado G0, el cual es usado para describir las células que han salido del ciclo celular y permanecen en un estado de quiescencia, no proliferativo (Figura 1). En G0, las células difieren mucho de las que se encuentran en G1; disminuye el tamaño celular debido a un desbalance entre la síntesis y degradación de los componentes celulares, además las enzimas y el transporte transmembranal son bajos. Las fases G1, S y G2, son imperceptibles a la vista y constituyen la etapa denominada interfase.<sup>2,3</sup> Sin embargo, la conservación de los procesos de crecimiento celular y división puede dissociarse, en casos especiales: por ejemplo, en los ovocitos, neuronas y células de músculo, puede existir crecimiento celular sin división celular y, en huevos fertilizados, puede existir división celular sin crecimiento celular; estos eventos pueden funcionar en forma independiente o complementaria.<sup>4</sup>

## Reguladores del ciclo celular

Para que se puedan llevar a cabo los diferentes eventos de la progresión del ciclo celular que alterna procesos de proliferación y procesos de diferenciación, es necesaria la participación de diversas moléculas que, junto con las condiciones del medio, controlan la duplicación celular. Tal es el caso de las cinasas dependientes de ciclinas (Cdks). De acuerdo con las últimas versiones de los genomas de humano y de ratón, hasta el momento se conocen 11 genes que codifican para las Cdks y otros 9 genes que codifican proteínas con similitudes estructurales conservadas.<sup>5</sup>

### Cinasas dependientes de ciclinas (Cdks)

Las Cdks representan la subunidad catalítica de una gran familia de enzimas que promueven la fosforilación de residuos de serina/treonina; las holoenzimas están formadas por complejos heterodiméricos con una de varias subunidades reguladoras denominadas ciclinas, las cuales han sido implicadas en el control de la progresión del ciclo celular. El primer miembro de la familia de Cdks, que se describió ahora recibe el nombre de Cdk1 y fue identificado mediante un tamizaje genético en mutantes de *Schizosaccharomyces pombe* y



**Figura 1. El ciclo celular.** El esquema muestra las diferentes fases del ciclo celular, y el tiempo promedio de cada una de las fases. Se observa como la presencia de factores de crecimiento inducen la progresión de las células en G0 a las siguientes fases del ciclo. La eliminación de estos puede mantener a las células en el punto R o regresar a G0.

*Sacharomyces cerevisiae* (Cdc2 y Cdc28 respectivamente), con defectos en la división del ciclo celular.<sup>6</sup> Este gen resultó ser equivalente a la subunidad catalítica p34 del factor inductor de la mitosis (FIM), identificado en *Xenopus laevis*, luego de la clonación de los miembros de esta familia. En 1991, en el Cold Spring Harbor Symposium on Cell Cycle, se decidió adoptar el término cinasas dependientes de ciclinas, de las que actualmente se conocen 11 miembros (Cuadro I).<sup>5</sup>

La actividad de las Cdks en el ciclo celular es un proceso altamente controlado a diferentes niveles; además de requerir subunidades activadoras (ciclinas), que también se unen a reguladores negativos inhibidores de Cdks o inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI) y adicionalmente están sujetas a regulación por fosforilación y desfosforilación de la subunidad catalítica. Las Cdks pueden ser fosforiladas en residuos de treonina (T172 en Cdk4 y T160 en Cdk2)

**Cuadro I. Complejos formados por las Cdks y las Ciclinas**

| CDK | Ciclinas con que se asocia       | Referencia  |
|-----|----------------------------------|---|
| 1   | A1, A2, B1, B2, B3, F            | Malumbres et al., 2005 <sup>7</sup><br>Conget et al., 2000 <sup>8</sup>   |
| 2   | A1, A2, E1, E2<br>D1, D2, B1, B3 | Aleemet et al., 2005 <sup>9</sup><br>Malumbres et al., 2004 <sup>10</sup> |
| 3   | E1, F2, A1, A2, C, D             | Ren et al., 2004 <sup>11</sup>  |
| 4   | D1, D2, D3                       |   |
| 5   | p35, p39<br>(D-E y TIPO G)       | Lilja et al., 2004 <sup>12</sup><br>Zhang et al., 2004 <sup>13</sup>      |
| 6   | D1, D2, D3                       |   |
| 7   | H                                | Lolli et al., 2005 <sup>14</sup>  |
| 8   | C                                | Akoulitchev et al., 2000 <sup>15</sup>                                    |
| 9   | K, T1, T2                        | Garriga et al., 2004 <sup>16</sup>  |
| 10  | Factor Ets2                      | Kasten et al., 2001 <sup>17</sup>   |
| 11  | L1, L2 (D)                       | Loyer et al., 2005 <sup>18</sup>  |

localizados en su asa "T" para llevar a cabo su propia actividad catalítica. Mientras que las cinasas Wee1 y Myt1 inhiben la actividad de cinasas de los complejos ciclinas-Cdks, por la fosforilación de residuos adyacentes de tirosina y treonina en la subunidad de Cdks. La fosfatasa Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C) activa estas cinasas al desfosforilar los residuos de amino ácidos (aa) fosforilados por las cinasa Wee1 y Myt1. De esta manera podemos ver que los complejos ciclina-Cdks requieren ser fosforilados en el asa "T" de la subunidad Cdk por la cinasa activadora de Cdks. Cuando ambas fosforilaciones, activadoras e inactivadoras existen simultáneamente en la misma molécula, las señales inhibitorias son dominantes y por lo tanto la cinasa carece de actividad, consiguiente la fosfatasa Cdc25 es la responsable de la activación.<sup>4,19</sup>

### Ciclinas

Estudios realizados en huevos de erizo de mar identificaron una serie de proteínas que se sintetizan y se destruyen en cada una de las divisiones embrionarias las cuales recibieron el nombre de ciclinas.<sup>20</sup> Fueron subsecuentemente clonadas de embriones fertilizados de almejas y erizos de mar, y se observó que éstas promueven la meiosis en ovocitos de *Xenopus laevis*.<sup>21</sup> Proteínas relacionadas designadas como Cdc13, ciclina A y ciclina B fueron aisladas de *S. pombe*, *S. cerevisiae* y células humanas. Posteriormente, se demostró el establecimiento de interacciones específicas proteína-proteína entre la Cdk1 y las ciclinas A y B en ovocitos de almejas, estrellas de mar y *X. laevis*.<sup>22</sup> Asimismo, se descubrieron otras ciclinas en mamíferos por complementación de mutantes de *S. cerevisiae* y células B de linfomas.<sup>23</sup>

Actualmente y de acuerdo con el genoma humano, se han identificado, al menos, 29 genes que codifican proteínas relacionadas que comparten una región conservada de 150 residuos de aa designados "caja de ciclinas" (cyclin box). Este dominio está formado por 5 regiones helicoidales y es responsable de la unión de supuestas proteínas de acompañamiento incluyendo las Cdk (Cuadro I).<sup>5</sup>

De las 29 proteínas designadas formalmente como ciclinas, algunas no se asocian a Cdks o a otras cinasas, tal es el caso de las ciclinas F, G, I, J, M, O y S. Sin embargo, el análisis de la secuencia del genoma humano ha identificado 7 locis adicionales que codifican a supuestas ciclinas de acuerdo con la secuencia homóloga a la caja de ciclinas, no obstante, hasta el momento no se han descubierto sus funciones.

### Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI)

Los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI) juegan papeles clave en la regulación de la proliferación y el desarrollo celular, a través del control que ejercen sobre transiciones críticas del ciclo celular y como efectores de vías de transducción que actúan en puntos de control del ciclo celular (checkpoints). Su importancia se ha puesto de manifiesto al encontrar que formas deficientes de estos inhibidores se asocian con el desarrollo de tumores. Su actividad es

altamente controlada a través del ciclo celular y en respuesta a varias señales. Mientras que algunas de estas proteínas inhibitorias se expresan y funcionan de manera constitutiva como p16, otras como p27 se expresan en respuesta a condiciones del medio ambiente y detienen el ciclo celular de manera transitoria. La regulación generalmente afecta el nivel o la disponibilidad de los CDKI que pueden cambiar sus actividades intrínsecas. Los mecanismos que controlan la función de los CDKI incluyen: 1) regulación de la transcripción, 2) traducción y 3) proteólisis. Sin embargo, algunas señales cambian la capacidad de los CDKI para interactuar con sus blancos específicos.<sup>24</sup>

Los CDKI que gobiernan estos eventos han sido asignados a una de las dos familias basadas en su estructura y blancos de Cdks. La primer clase incluye a las proteínas INK4, las cuales son nombradas de esta forma por su capacidad de inhibir específicamente la subunidad catalítica de las proteínas monoméricas Cdk4 y Cdk6, formando complejos binarios y está formada por cuatro proteínas: p16<sup>INK4</sup>,<sup>25</sup> p15<sup>INK4</sup>,<sup>26</sup> p18<sup>INK4</sup>,<sup>27</sup> y p19<sup>INK4</sup>.<sup>28</sup> Las cuatro proteínas comparten una identidad de aproximadamente un 40% y bioquímicamente son muy similares.<sup>29,30</sup> No obstante, se sugiere que pueden tener un efecto inhibitorio formando un complejo ternario: INK4-Cdk4-ciclina D, con la unión específica a la holoenzima, bloqueando el complejo. Análisis estructurales de los complejos p16-Cdk6, p19-Cdk6 y p18-Cdk4 pudieron confirmar esto, ya que las proteínas INK4 se unen a regiones cercanas al sitio de unión de ATP del surco catalítico y opuesto al sitio de unión de ciclinas de las Cdk4 y Cdk6, induciendo un cambio conformacional que distorsiona la región catalítica y altera alostéricamente el sitio de unión de la ciclina D, favoreciendo su disociación.<sup>31</sup>

Para el caso de p16, el miembro prototípico de la familia, se ha demostrado que es un inhibidor específico de Cdk4.<sup>25</sup> Asimismo, es importante mencionar que la transcripción de p16 puede ser reprimida por la proteína del retinoblastoma (Rb).<sup>32</sup>

Los complejos ciclinas/Cdks pueden ser contrarrestados por inhibidores de acción más amplia que forman la segunda clase de CDKI, la familia Cip/Kip, cuyas acciones afectan las actividades de las Cdks asociadas a las ciclinas A, D y E. Esta clase está formada por las moléculas: p21<sup>Cip/Waf1/Edi1</sup>,<sup>33,34</sup> p27<sup>Kip1</sup><sup>35</sup> y p57<sup>Kip2</sup>.<sup>36</sup> Cada una de las cuales contiene regiones características en el amino terminal que aumentan la unión tanto a las ciclinas así como a las subunidades de Cdks.<sup>37,38</sup> Estas moléculas forman complejos ternarios con la ciclina B/CDC2, ciclina A/Cdk2, ciclina E-Cdk2, ciclina D-Cdk4 y ciclina D-Cdk6.<sup>39</sup>

Basados en un gran número de experimentos *in vitro* y en los estudios de sobreexpresión *in vivo*, se ha demostrado que los CDKI de la familia Cip/Kip, interfieren con las actividades de las Cdks asociadas a las ciclinas A, D y E. Trabajos más recientes han revelado que aunque las proteínas Cip/Kip son potentes inhibidores de la Cdk2 dependientes de las ciclinas E y A, también actúan como reguladores positivos de las cinasas dependientes asociadas a la ciclina D.<sup>19</sup>

La expresión de genes inhibidores individuales de Cdk, es regulada por diferentes señales antiproliferativas tales

como el daño al ADN por radiación ionizante, o la inhibición de la proliferación por la presencia del Factor de Crecimiento Transformante Tipo Beta (TGF- $\beta$ ). El factor de transcripción p53 activa la expresión de inhibidores como p21. Por otro lado, la función de Rb, reprime la transcripción de p16, y el TGF- $\beta$  estimula la transcripción de p15.<sup>40</sup>

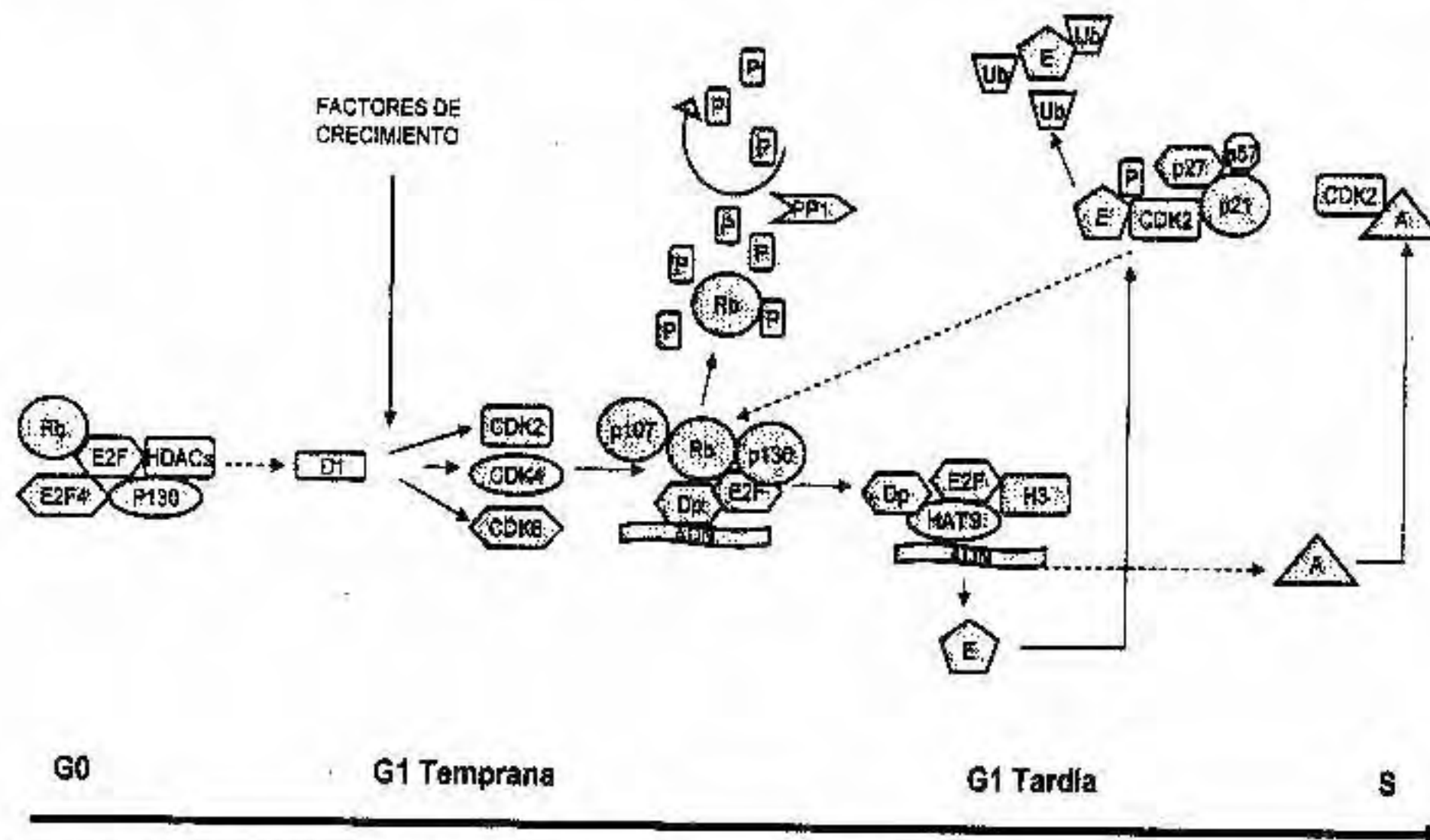
### El factor de elongación de la transcripción E2F

E2F es un miembro representativo de una familia de factores de transcripción E2 (E2F) que actúan como efectores río abajo de la vía de Rb y juegan un papel importante en la división del ciclo celular.<sup>41</sup> Se consideran como reguladores positivos de genes requeridos para la síntesis de ADN, aunque también pueden funcionar como represores de la transcripción que actúa en la proliferación y en la diferenciación, como reguladores de la muerte celular, de la oncogénesis y la supresión de tumores.<sup>42</sup> En células de mamífero, la actividad de E2F se genera por una amplia gama de complejos interconectados en donde participan siete genes de E2F: dos genes DP (DP1 y DP2) y tres genes que codifican a las proteínas de la familia de Rb (Rb, p107 y p130). E2F1, E2F2 y E2F3 (E2F3a) (la cual difiere sólo en el amino terminal con el represor E2F3b) son potentes activadores transcripcionales, los cuales interactúan exclusivamente con Rb y se expresan frecuentemente durante el ciclo celular. E2F4 y E2F5 se expresan en algunos tipos celulares, se consideran pobres activadores de la transcripción y funcionan como represores, ya que reclutan a las proteínas asociadas a promotores reguladores de E2F. E2F4 puede interactuar con las tres proteínas pocket y E2F5 se puede unir a p130.<sup>43</sup> E2F3b es el complejo predominante E2F-Rb en algunos tipos de células quiescentes y funciona como un represor transcripcional.<sup>44</sup> Los miembros E2F6 (en altos niveles de expresión retrasa la re-entrada al ciclo celular y reprime los genes de respuesta a

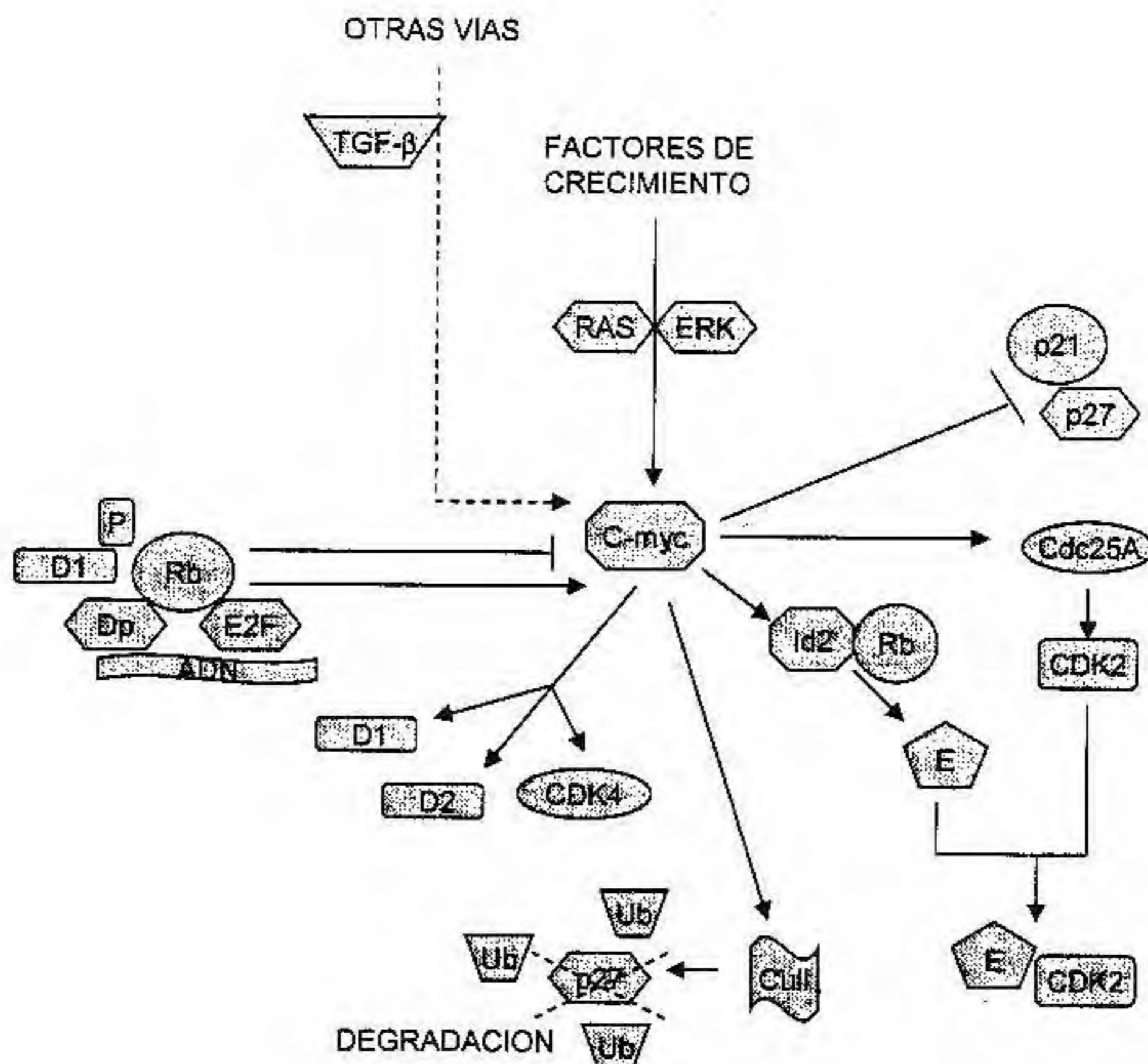
E2F) y E2F7 (se asocia con promotores de E2F durante las fases G2 y S del ciclo celular) que tienen truncado el dominio de unión a las proteínas "pocket" y a la transactivación; por lo que ellos bloquean la transcripción de forma independiente de las proteínas pocket.<sup>45</sup> Las proteínas presentan dos dominios de unión a ADN de forma independiente de DP, y los loci de E2F6 y E2F7 producen importantes RNAs con empalmes alternativos, los cuales codifican distintas isoformas de proteínas, ya que se han demostrado dos isoformas de E2F7 y dos y cuatro isoformas en humano y ratón de E2F6. La función más ampliamente estudiada y mejor entendida de E2F es su capacidad para regular la transición de G1/S y la entrada a la fase S durante el ciclo celular.<sup>46</sup> Cabe mencionar que se han identificado una gran variedad de proteínas virales entre las que destacan el antígeno T grande de SV40, y la proteína E6 del papiloma virus humano (HPV-16), que compiten con los miembros de la familia E2F por su sitio de unión en la proteína Rb. La sobre-expresión de estas proteínas virales da como resultado un exceso de formas libres de E2F y que favorecen la entrada a la fase S.

### La proteína del retinoblastoma (Rb)

Rb es una proteína nuclear que pertenece a una familia de tres miembros como se mencionó anteriormente, los cuales presentan múltiples sitios que son fosforilados por las Cdk's (Figura. 2). Rb se mantiene mínimamente fosforilada (hipofosforilada) en células quiescentes o G0, pero cambia a un estado altamente fosforilado (hiperfosforilada) durante la progresión de G1 y se mantiene así hasta el final de la mitosis. Rb fosforilada libera al factor de transcripción E2F, permitiendo la expresión de algunos genes que codifican proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular y síntesis de ADN, incluyendo la ciclina E, la cual es requerida para la activación de la Cdk2. De esta manera el complejo ciclina E-



**Figura 2.** Fosforilación de la proteína Rb y progresión del ciclo celular. Rb o alguno de los miembros de la familia (p107 o p130), al ser fosforilados, liberan factores de transcripción (E2F y Dp) necesarios para la expresión de genes involucrados en las diferentes fases del ciclo celular.



**Figura 3.** Control de la función de *c-myc*. *C-myc* activada por Ras-ERK favorece la progresión del ciclo celular mediante la activación transcripcional de la ciclina D2 y CDK4, así como la modulación transcripcional de la ciclina D1, la activación del complejo ciclina E-CDK2 a través de Cdc25A, la represión transcripcional de p21, p27 y promoviendo la proteólisis de p27 a través de Cull.

Cdk2 participa en el mantenimiento de Rb en un estado hiperfosforilado y participa en el proceso de retroalimentación positivo para la acumulación de E2F activo, como algunos otros complejos de ciclina-Cdk, el complejo ciclina E-Cdk2 fosforila la histona H1 y esta actividad puede ser importante para el rearrreglo de la cromatina, requerido durante la replicación del genoma<sup>47</sup> y la duplicación del centrosoma.<sup>48</sup> En este evento, también participa un sustrato del complejo ciclina E-Cdk2, una proteína nuclear llamada NPAT, la cual está presente en todas las etapas del ciclo celular y su fosforilación está implicada en la expresión de la histona, un proceso requerido para la entrada a la fase S.<sup>49,50</sup>

### *C-Myc*

El gene *c-myc* es transcrito en una forma estrictamente dependiente de la proliferación celular, por lo que es considerado un importante regulador de la proliferación. *C-myc* es parte de una pequeña familia de 4 miembros relacionados entre sí (*c-*, *N-*, *L-* y *s-myc*) y *B-myc*; aunque este último carece

de los dominios importantes para la función de las proteínas Myc. Las proteínas Myc, son factores de transcripción de la familia de zipper de leucina y dominio helice-asa-helice, que activa la transcripción formando heterodímeros con las proteínas Max. *C-myc* es un factor transcripcional, involucrado en la carcinogénesis a través de su papel en el control del crecimiento y la progresión del ciclo celular. Su sobre-expresión promueve la transición G1-S (Figura 3).<sup>51-53</sup>

### Punto de restricción

El término Punto de Restricción (R) fue acuñado en 1974 por Arthur Pardee, para definir un evento específico en G1 después del cual las células cultivadas pueden proliferar independientemente de un estímulo mitogénico. Las células cultivadas de mamífero que han sufrido mitosis tres horas previas, pueden ser detenidas de la progresión a través del ciclo celular por eliminación de factores de crecimiento o inhibición moderada de síntesis de proteínas. Estas células





además de su función inhibitoria, también participan en el ensamblaje de los complejos ciclina D-Cdk4 y ciclina D-Cdk6 durante la fase G1 temprana.<sup>58</sup>

Las ciclinas del tipo D como se mencionó antes, son las primeras ciclinas que son inducidas, permitiendo que las células salgan de G0 y puedan incorporarse al ciclo celular, y son importantes integradores del señalamiento mitogénico; la disponibilidad de la ciclina D1 es controlada por un balance entre las vías mitogénicas RAS/RAF/MAPK (para la síntesis de la ciclina D1) y RAS/PI3K/ATK (para darle estabilidad a la ciclina D1) así como por la actividad GSK-3beta y la actividad de SCF (favoreciendo la degradación de la ciclina). Asimismo, se ha observado que células en ausencia de la ciclina D1 pueden proliferar indicando que esta molécula no es estrictamente necesaria para G1, ya que como los tres tipos de ciclinas presentan una alta homología y son co-expresados en algunos tejidos, es posible que tengan funciones redundantes; sin embargo, la ciclina D1 facilita el paso a través de G1 y promueve la proliferación celular (Cuadro II). De igual manera, esta vía regula la síntesis de la familia de inhibidores CIP/KIP, ya que se ha demostrado que la estimulación con factores de crecimiento de células quiescentes causa la re-entrada del ciclo celular y la expresión transitoria de p21, la cual es dependiente de la actividad de MAPK.

### Fase G1

La fase G1 originalmente fue definida como un intervalo de tiempo (Fase Gap) entre los eventos claramente observados de síntesis de DNA y la mitosis, que aparece al término de las divisiones embrionarias, en donde sólo se presentan en forma alterna las fases M y S. Este es un intervalo de tiempo que requiere de algunas horas en diferentes células, durante el cual las células están sujetas a estimulación por mitógenos extracelulares, factores de crecimiento, o inhibidores de la proliferación, los cuales determinan cuando una célula quies-

cente puede iniciar con la proliferación, una célula en G1 puede seguir ciclando o regresar a un estado quiescente (Figura 2). La progresión a través de G1 es regulada por un mecanismo complejo que involucra tres Cdks (Cdk2, Cdk4 y Cdk6) con sus respectivos reguladores (tales como ciclinas e inhibidores). Posterior a la señal mitogénica, se induce la síntesis de la ciclina D y posiblemente el transporte de Cdk4 y Cdk6 al núcleo. Los complejos activos Cdk4, Cdk6 unidos a las ciclinas tipo D, son esenciales para el paso a través de la fase G1, y ellos ejercen su regulación en la progresión del ciclo celular, a través de la fosforilación de diferentes sustratos entre los cuales la proteína Rb juega un papel preponderante.<sup>59</sup>

### Fase S

En la fase S se lleva a cabo la duplicación de los cromosomas y del centrosoma, es el momento en que la célula se prepara para la división celular. En este punto existe un punto de control o checkpoint, que asegura que el ADN no presente alteraciones antes de la replicación. Se caracteriza por la expresión de las enzimas necesarias para la biosíntesis de purinas y pirimidinas y de la maquinaria de replicación, en donde destacan el antígeno de proliferación nuclear "PCNA" y la polimerasa de ADN. Durante esta fase se expresa el antígeno Ki 67 cuya función se desconoce pero, sirve como un marcador histopatológico de células proliferantes. La ciclina A, también es regulada por E2F, y se acumula en la transición de la fase G1-S y persiste a través de toda la fase S. El inicio de la fase S correlaciona con la formación de los complejos ciclina A-Cdk2, pero al final de la fase S ésta se asocia con la Cdk1 (Figura 2). De esta manera, se puede observar que la ciclina A asociada a la actividad de cinasas, es necesaria para la entrada a la fase S, su culminación y entrada a la mitosis. Debido a que el genoma eucariótico es extremadamente largo ( $10^7$  a  $10^9$  pares de bases - pb-), la duplicación ocurre como un proceso simultáneo entre 10,000

**Cuadro II. Complejos formados por las Ciclinas-Cinasas Dependientes de Ciclinas (Cdks). Se muestra la Interacción formada por las ciclinas-Cdks y los sitios de unión, así como sus respectivos sustratos en las diferentes fases del ciclo celular.**

| CDK | Ciclina                      | Actividad en las fases del ciclo celular | Motivos de unión a ciclinas | Sustratos                                 |
|-----|------------------------------|--|-----------------------------|---|
| 1   | A1,A2,B1,B2,B3, E            | G2/M                                     | PSTAIRE                     | Histona H1, p53, Rb, STAT 3<br>STAT 3     |
| 2   | A1, A2, E1, E2D1, D2, B1, B3 | G1-S                                     | PSTAIRE                     | B-Myb, p21, p27, p53, p107, pRb, Smad3    |
| 3   | E1,F2,A1,A2, C               | Go-G1-S                                  | PSTAIRE                     | CABLES 1                                  |
| 4   | D1, D2, D3                   | G1-S                                     | PISTVRE                     | p107, p130, pRb, Smad3                    |
| 5   | P35, P39 (D-E y TIPO G)      | Senescencia                              | PSSALRE                     | Inhibidor de proteína fosfatasa 1, STAT 3 |
| 6   | D1, D2, D3                   | G1-S                                     | PLSTIRE                     | p107, p130, pRb                           |
| 7   | H                            | Cinasa activadora DE CDK                 | NRTALRE                     | CDK-CDK6, p53, RNA polimerasa II          |
| 8   | C                            | Transcripción                            | SMSACRE                     | RNA polimerasa II                         |
| 9   | T1, T2                       | Transcripción                            | PITALRE                     | pRB, RNA polimerasa II                    |
| 10  | ¿?                           | G2-M, Transcripción                      | PISSLRE                     | ¿?  |
| 11  | L1, L2 (D)                   | M, Transcripción                         | SMSACRE                     | Ciclina L                                 |

y 100,000 sitios de síntesis paralelas, también denominadas orígenes de replicación.<sup>60</sup> Asimismo, se ha podido demostrar que el inicio de la replicación del ADN se lleva a cabo en dos pasos: el primero está dedicado al ensamblaje de los factores de iniciación al origen de la replicación, y el segundo consiste en la inducción de los complejos para activar la síntesis del ADN mediante la acción de proteínas cinasas. El origen de replicación del ADN, también llamado secuencia de replicación autónoma (ARS) contiene regiones consenso altamente conservadas de 100 a 200 pb, conocidas como secuencias consenso (ACS), la cual es un componente esencial del origen de replicación, que se une al complejo del origen de reconocimiento (ORC); hasta el momento, se han identificado 3 subunidades ORC en el humano HsORC1, 2 y 4.<sup>61</sup>

Por otra parte, se ha demostrado que CDC6 es una proteína adaptadora clave para las interacciones del ORC, con diferentes proteínas como las del mantenimiento del minicromosoma (MCM) en la replicación del ADN. Esta molécula se fosforila en el núcleo durante la fase S, por el complejo ciclina A-CDK2 y posteriormente se transporta al citoplasma.<sup>62</sup> Las proteínas MCM están formadas por un complejo de 6 proteínas relacionadas que forman un componente esencial del complejo de iniciación del ADN, estas se asocian con la cromatina en la fase G1, y en la fase S son fosforiladas, por lo que se reduce su afinidad a la cromatina, lo que asegura que la replicación ocurra sólo una vez por ciclo. De igual forma, otras dos cinasas son importantes en el inicio de la replicación, tal es el caso de las CDKs y la cinasa Dbf4/CDC7, las cuales pueden asociarse con las proteínas MCM.<sup>63</sup>

### Transición G2/M

La fase G2 es la segunda fase gap en el ciclo celular en el cual la célula evalúa el estado del material genético replicado y se prepara para la fase M; en esta fase, el complejo ciclina B-CDC2 es el regulador mitótico clave de la transición G2/M. La síntesis de la ciclina B se inicia al final de la fase S, y hasta el momento se conocen 2 isoformas B1 y B2. B2 no es importante para el crecimiento y el desarrollo, ya que se asocia con el aparato de Golgi; mientras que B1 es responsable de algunas de las acciones de CDC2 en el citoplasma y el núcleo, y puede compensar la ausencia de B2. La CDC2 es fosforilada positivamente por la cinasa activadora de CDK (CAK) en la región conservada de Thr 160 y en la fase G2, el complejo ciclina B-CDC2, sin embargo se mantiene en un estado inactivo por la fosforilación de CDC2 en el residuo de Thr 14 que evita la unión de ATP y en el residuo de Thr 15, que interfiere con la transferencia del fosfato. El complejo nuevamente es activado después de la defosforilación de estos sitios por la fosfatasa CDC25C.<sup>64</sup>

### Fase M

La mitosis, involucra las etapas de cariocinesis (división del contenido cromosómico celular) y citocinesis (división del contenido citoplásmico), mismas que constituyen la fase más corta del ciclo celular eucariótico, ya que dura entre 1 y 2 hrs

en células de mamífero. Esta comprende: profase, prometafase, metafase anafase y telofase.

Un evento relevante durante la mitosis es la ruptura de las láminas nucleares (A, B y C), las cuales están formadas por filamentos intermedios de lámina, localizados adyacentes a la cara interna de la envoltura nuclear. Durante la mitosis temprana, el Factor Promotor de la Maduración (FPM), constituido por la proteína cinasa de 34 Kda y CDK1 (p34<sup>cdc2</sup> / CDK1) unido a la ciclina B, (Complejo ciclina B-CDC2) fosforila residuos específicos de serina en las tres láminas nucleares, causando la despolimerización de estos filamentos intermedios. En esta etapa, se registra un incremento en los niveles de las ciclinas A y B de las cuales la primera puede formar complejos con Cdk1 o la proteína cinasa de 34 kDa (activa también en la mitosis en levaduras) para fosforilar sustratos ricos en residuos de serina y treonina. Además de la lámina nuclear, este complejo fosforila otros sustratos como la vimentina (constituyente de los filamentos intermedios que se extiende a través del citoplasma), y caldesmona (componente no estructural de los microfilamentos citoplásmicos). El complejo p34/ciclina B induce la hiperfosforilación de la lámina y promueve el desensamblaje de la lámina nuclear y su ruptura. La reorganización del citoesqueleto en la fase M se produce por la fosforilación de la vimentina y caldesmona.<sup>65</sup>

El complejo ciclina B-CDC2, está involucrado en el inicio de diferentes eventos mitóticos, tanto en el citoplasma así como en el núcleo. Durante la profase, B-CDC2 está asociado con centrosomas duplicados y esto promueve la separación del centrosoma por la fosforilación de la proteína Eg5 asociada al centrosoma. La ciclina B1-CDC2 y/o los complejos B2-CDC2 también están involucrados en la fragmentación del Golgi por tanto, el complejo y B-CDC2 están relacionados en reorganizar completamente la arquitectura celular durante la mitosis.<sup>66</sup>

De acuerdo con lo antes descrito, se puede observar que la progresión del ciclo celular es un proceso extremadamente complejo, en el que están involucradas un gran número de moléculas, las cuales cumplen con una función particular, en donde las diferentes señales externas pueden favorecer una progresión continua, división, paro del ciclo (ya sea por eventos de maduración y/o diferenciación), reparación de algún daño detectado en el ADN o la muerte; todo esto implícito en el tiempo de duración del ciclo celular, el cual es muy variable, y éste va a depender del tipo celular, de las condiciones del medio y el estado de maduración de las células.<sup>3</sup> Un buen modelo de estudio, en donde se pueden observar los diferentes cambios presentes durante los procesos de proliferación y maduración celular, es el relacionado con las células troncales y progenitoras hematopoyéticas.

### Hematopoyesis

La hematopoyesis es un proceso finamente regulado, mediante el cual se generan todas las células de la sangre. Este se lleva a cabo en diferentes órganos a lo largo del desarrollo prenatal, iniciando en el saco vitelino, y siguiendo en el

hígado fetal, bazo fetal y médula ósea (MO). Este último es el órgano en el que se desarrolla más del 95% de la actividad hematopoyética en la etapa postnatal.<sup>67</sup>

### Células progenitoras

De acuerdo con las características que presentan las células, el sistema hematopoyético se ha dividido en cuatro compartimientos (Figura 5).

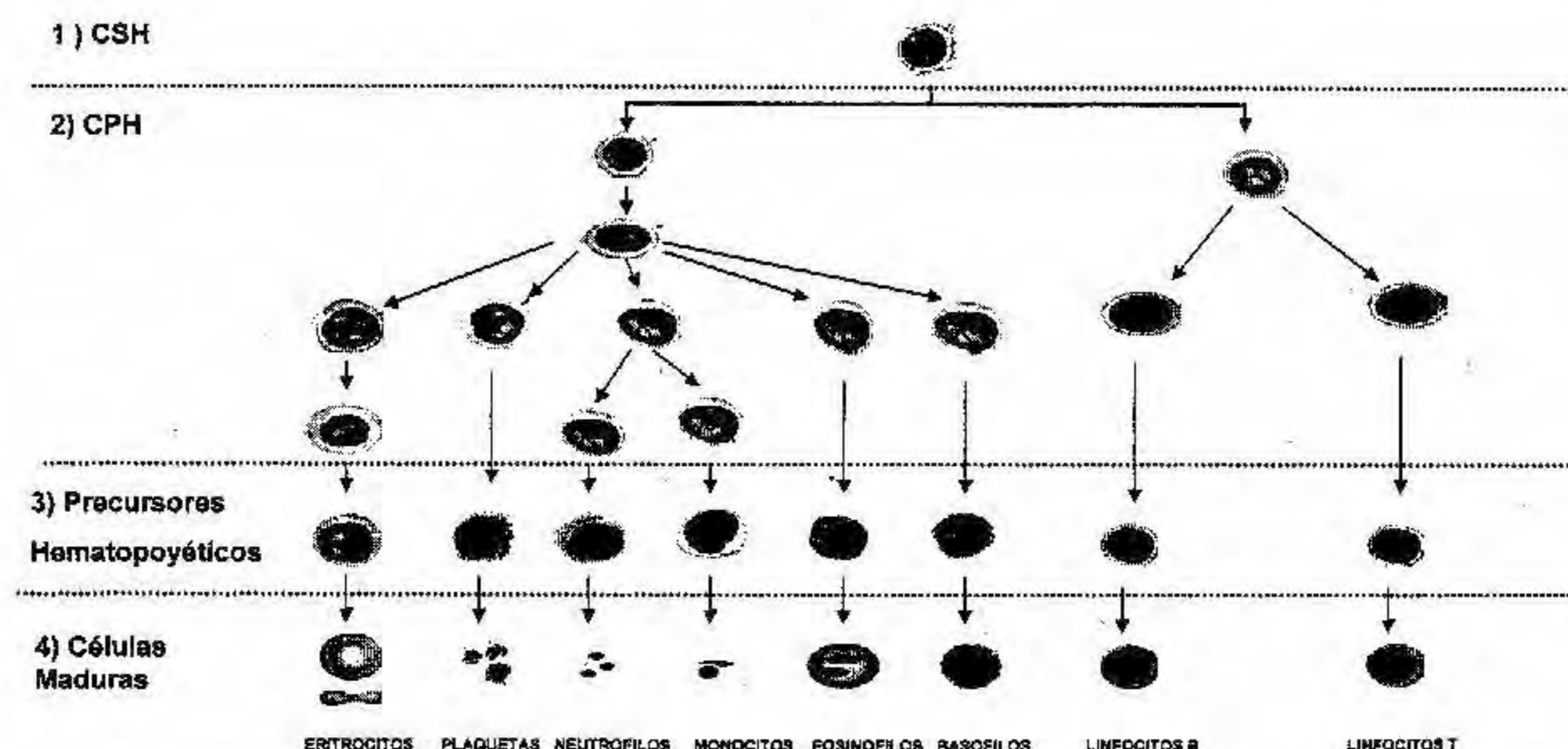
- 1) Células Troncales Hematopoyéticas (CTH), consideradas las más primitivas, capaces de autorrenovarse, originar células de los distintos linajes sanguíneos y restablecer la hematopoyesis *in vivo*. Las células hematopoyéticas más primitivas no presentan marcadores de linaje (Lin<sup>-</sup>) y mantienen una morfología que no corresponde a ninguna línea de diferenciación definida. El principal marcador usado para su aislamiento ha sido la molécula CD34, la cual participa en mecanismos de adhesión celular. Las células CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>, que incluyen a las células progenitoras representan aproximadamente, el 0.5% del total de las células de la médula ósea. A su vez a partir de células CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> puede ser aislada otra subpoblación carente del antígeno CD38 conocida como CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>, que incluyen a células progenitoras, representa menos del 0.2% del total de las células de la médula ósea.<sup>68</sup>
- 2) Células progenitoras hematopoyéticas (CPH), una población extremadamente heterogénea, que representa entre el 0.1-0.5% del total de las células presentes en médula ósea. Las CPH son positivas al antígeno CD34 e incluyen células positivas y negativas a los diferentes linajes sanguíneos. Estudios *in vitro* han mostrado que estas células se caracterizan por su capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos.
- 3) Precursores reconocibles morfológicamente, que representan más del 95% de las células residentes de la médula ósea.

- 4) Células sanguíneas maduras, las cuales después de un proceso de proliferación, diferenciación, maduración, e incluso apoptosis, se encuentran presentes en la circulación.<sup>69</sup>

Durante muchos años, la MO fue la principal fuente de CTH y CPH; sin embargo, desde 1976, y en 1988, se demostró la presencia de CTH y CPH en la sangre periférica de pacientes tratados con quimioterapia y factores de crecimiento, tales como el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). Al igual que lo observado por Broxmeyer en la sangre del cordón umbilical (SCU). Se ha demostrado que estas dos fuentes ricas en células troncales y progenitoras hematopoyéticas, tienen un potencial de proliferación que llega a ser superior al de la MO; como ha sido observado en la SCU, y actualmente se usan como un buen recurso en terapias clínicas para trasplantes en enfermedades hematológicas y no hematológicas.<sup>70</sup>

### El ciclo celular en células progenitoras hematopoyéticas

Las CTH tienen la capacidad de renovarse indefinidamente, mientras poseen el potencial para diferenciarse en múltiples linajes. No obstante, *in vivo*, su tasa de proliferación bajo condiciones fisiológicas es mucho más lenta que la de su progenie intermedia, en las que se incluye a las células progenitoras y precursoras proliferantes. La quiescencia observada en estas células, asegura que la población de las CTH no se pierda bajo condiciones de estrés fisiológico y pueda mantenerse a lo largo de toda la vida del individuo.<sup>71</sup> La proliferación altamente regulada ocurre a una tasa muy limitada, bajo las condiciones de procesos homeostáticos. De esta forma, se mantiene la hipótesis, de que la alta quiescencia de las células CTH, refleja el completo arresto del ciclo celular de la mayoría de las células en el compartimiento de las CTH, llamado "el modelo de sucesión clonal".<sup>72</sup>



**Figura 5.** Proceso hematopoyético. La hematopoyesis se ha dividido en cuatro compartimientos debido a las características que se presentan en cada una de las subpoblaciones. Ver texto.

Recientemente se postuló, que la posición específica en el ciclo celular determina cuándo una célula primitiva funciona como una célula CTH o CPH, lo cual sugiere que el estímulo recibido en distintas fases del ciclo celular, puede llegar a provocar proliferación y/o diferenciación.<sup>73</sup>

La quiescencia relativa de las CTH puede prevenir su prematura reducción numérica *in vivo*, pero ha sido considerada uno de los obstáculos en el contexto de la expansión *in vitro*, necesarios para el trasplante de CTH y la terapia génica. En los últimos años, diversos estudios se han enfocado en encontrar las condiciones de cultivo *in vitro* que permitan expandir y mantener la población de las CTH capaces de repoblar la médula ósea de individuos inmunosuprimidos. Los esfuerzos realizados se han centrado en el uso de diferentes citocinas recombinantes hematopoyéticas, para de esta forma lograr expandirlas, en donde se considera que los reguladores del ciclo celular pueden jugar papeles importantes en estos procesos.

En células de mamífero, la maquinaria del ciclo celular que determina cuando una célula puede continuar proliferando o puede detener su división y diferenciarse, opera ampliamente en la fase G1. Se ha demostrado que las dos familias de reguladores del ciclo celular (Cip/Kip e INK4), son esenciales en el arresto de la progresión del ciclo celular, en un amplio espectro de tipos celulares.<sup>74</sup> Para definir los mecanismos en la respuesta de las CTH se requiere del análisis de reguladores de forma individual y así poder describir cómo estos reguladores interactúan con otras moléculas e intersectan varias vías de señalización. Específicamente, en el sistema hematopoyético se ha detectado que algunos miembros de la familia de reguladores se expresan de forma diferencial en las células CD34+.<sup>71,75-78</sup>

Se ha encontrado que en las CTH humanas quiescentes el RNAm es muy reducido y en las CPH este se encuentra más abundante; de igual forma, se ha detectado que p21 gobierna la entrada del ciclo celular de las mismas CTH y que su ausencia incrementa la capacidad proliferativa.<sup>79,80</sup>

De esta manera, se puede determinar que el éxito de la capacidad proliferativa y de expansión, entre otros factores, está directamente relacionado con el estado de quiescencia en el que se encuentran estas células; ya que se ha demostrado que un alto porcentaje de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas se encuentran en la fase G0/G1 del ciclo celular. Asimismo, se ha observado, que las CPH, que se encuentran en la fase G0, tienen un mayor potencial de proliferación que aquellas que se encuentran en la fase G1.<sup>81</sup> Sin embargo, no todas las células tienen ese potencial de proliferación y esto también va a depender del destino celular, ya que de la población de CTH y CPH que presentan el antígeno CD34, no todas están destinadas a dividirse y como consecuencia a diferenciarse, o bien pueden dividirse y mantener las mismas características de una célula pluripotencial, o bien llegar a diferenciarse. Debido a esto, dichas poblaciones celulares derivadas del sistema hematopoyético, han sido aisladas y sujetas a estudios *in vivo* e *in vitro*, para medir su función hematopoyética y dependiendo del grado de aislamiento y purificación, se ha encontrado que las CTH no son una población homogénea, ya que se reagru-

pan en subpoblaciones que expresan diferentes antígenos de superficie, con potenciales de diferenciación y proliferación variable.<sup>82, 83</sup>

De acuerdo con lo anterior, se sugiere que las diferentes subpoblaciones de células CD34+ presentan variaciones en el número de moléculas reguladoras del ciclo celular, las cuales estarían muy relacionadas con los eventos celulares que se han observado *in vitro*. Tal es el caso del proceso de diferenciación, que se asocia con una disminución de la proliferación celular y a la salida de las células del ciclo celular. En este proceso se ha encontrado una participación importante de p21 y p27;<sup>74,84,85</sup> ya que la diferenciación celular frecuentemente involucra picos secuenciales en la expresión de los CDKs, por ejemplo: un incremento en los niveles de expresión de p27, es seguida de un incremento en la regulación de p21 en importantes tipos celulares, inducidos a diferenciarse por diversos estímulos.

A continuación, se muestran algunas de las evidencias que se tienen en líneas celulares, CTH y CPH, haciendo énfasis particular en los CDKs, ya que debido a su importancia en la regulación del ciclo celular, son elementos clave en procesos de proliferación y diferenciación.

Entre otras, se ha observado que en la línea celular mielóide M07e y en progenitores mieloides de ratón, la presencia del Factor de Células Stem (SCF) y el Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF), actúan de forma sinérgica y esto induce la sobreexpresión de p21, y como consiguiente una disminución de p27; de esta manera p21 se asocia con la proteína CDK2, la cual incrementa su actividad y por lo tanto los niveles estequiométricos de las moléculas. Evento que tiene como consecuencia un incremento en la capacidad proliferativa de las células, importante para el mantenimiento del compartimiento de las CTH y CPH.<sup>86</sup>

De igual manera, en diversas líneas celulares leucémicas, tales como la HL-60, en donde se observaron diferencias en la expresión de p21 y un arresto del ciclo celular, esto de acuerdo con las condiciones de cultivo utilizadas, las cuales pueden ser o no independientes de la presencia de p53;<sup>87</sup> ya que en el caso de la línea K562, se ha demostrado que el gene WAF1/CIP1 que codifica a p21, puede participar activamente en una disminución de la proliferación y un incremento en la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago. Lo cual sugiere que el gene WAF1/CIP1 puede ser regulado a través de múltiples mecanismos.<sup>88</sup> Años más tarde, se demostró en la misma línea celular, usando un vector de expresión de p21, que p21 induce la expresión de p27 y una disminución de su degradación por ubiquitina, todo esto demuestra que durante la diferenciación, se facilita una ordenada transición entre las dos moléculas, cada una de las cuales puede influenciar de distinta forma el proceso de diferenciación.<sup>89</sup> Mientras que en la línea U937, se demostró que la inducción de la expresión de p21, esta acoplada a la expresión de marcadores de diferenciación temprana. No obstante, en tales eventos, no se descarta la posibilidad de la participación de p27 en este proceso de diferenciación.<sup>90</sup> Tal es el caso de la línea celular de leucemia megacarioblástica CMK y UT27, en donde la sobre-expresión de p27, asociada con un incremento en la

expresión de p21, se induce la diferenciación de megacariocitos, además de que bajo estas condiciones no se detecta una participación de p16, p15 o p18.<sup>91,92</sup> Al igual que lo observado en la línea MEG-01s, en donde se observa la formación de complejos triméricos p21/p27/ciclina E.<sup>93</sup> Mientras que, en la línea celular macrófaga de ratón BAC1.2F5A, se ha demostrado que la presencia de Interferón-gama (INF- $\gamma$ ) promueve una disminución de la expresión de la actividad cinasa de CDK2, no se observan cambios en p21 durante la progresión del ciclo celular, y los niveles de p27 son máximos en la fase G1 temprana, para posteriormente disminuir de forma gradual conforme avanza el ciclo celular, lo que evita la formación activa de los complejos CDK2/p27, evitando la progresión a través de la fase S y por lo tanto, la diferenciación.<sup>94</sup> En el caso de la línea celular eritroleucémica HB60-5, que prolifera y se diferencia en presencia de SCF y Eritropoyetina (Epo), después de 48 hrs de cultivo, se ha observado que con la sola presencia de Epo, se inhiben las actividades de CDK4 y CDK6, este evento se asocia con un incremento en la unión de p27 y p15 a CDK6; y un incremento de p27 unido a la ciclina A y E, lo cual correlaciona con la inhibición de CDK2; no obstante, no se detecta una participación de p27 en el proceso de diferenciación hacia el linaje eritroide, lo que indica que los niveles de expresión de p27, son necesarios para la diferenciación inducida por SCF.<sup>95</sup>

En la línea de células progenitoras mieloides de ratón 32Dcl3, la presencia de interleucina 3 (IL-3) mantiene en un estado indiferenciado a estas células, debido a un incremento en la expresión de p21 y del receptor para IL3 (RIL-3), lo cual produce un defecto en la maduración de linaje mielóide, ya que las células se mantienen como mieloblastos. Estas evidencias han sido correlacionadas con la patogenia de la Leucemia Mielóide Aguda (LMA).<sup>96</sup>

Se ha mostrado en diversas líneas celulares inducidas al proceso de diferenciación una sobrerregulación de p21. Sin embargo, los mecanismos de la inducción de p21 durante la diferenciación normal no es muy clara. En células precursoras de SCU, se ha demostrado un incremento en el nivel de expresión de p21, relacionado con la maduración mielóide;<sup>97</sup> y en colonias derivadas de células CD34+ de SCU, médula ósea y SPM se ha observado un incremento en el ARNm de p21 a través del tiempo, en granulocitos, macrófagos, megacariocitos y eritroblastos, mientras que por su parte el nivel de p27 se mantiene bajo, excepto en las colonias explosivas eritroides. La proteína p27 es constante en megacariocitos y monocitos de SPM y MO y células plasmáticas.<sup>75,98</sup>

Asimismo, se ha determinado *in vitro*, la participación de p21 y p27 en la diferenciación normal de blastos de células CD34+, y se ha encontrado que p27 es expresada en células CD34+ frescas, mientras que el nivel de p21 correlaciona con la tasa proliferativa; sin embargo, dicha expresión disminuye cuando las células alcanzan un proceso de diferenciación terminal; por su parte, p27 se mantiene constante durante todo el proceso, con diferentes sitios de localización subcelular.<sup>77</sup>

Por otro lado, recientemente se demostró en una rara subpoblación de células CD34+Lin de SCU, una marcada resistencia a ciclar en presencia de factores de crecimiento y

citocinas durante varios meses, y se determinó que p27 se expresa de una forma constante durante todo el tiempo de cultivo, mientras que la expresión de p21 es muy variable, no obstante, mantiene a las células en una prolongada quiescencia, siendo indispensable y p27 necesaria para el arresto del crecimiento.<sup>99</sup> Siguiendo con este punto, se demostró que p27 participa en la regulación de la autorrenovación y la diferenciación de las CTH de médula ósea.<sup>100</sup>

En lo que respecta a p16, se ha detectado una alta expresión en las CTH de MON; sin embargo, su presencia disminuye en progenitores comprometidos y en relación con la entrada a la fase de síntesis del ciclo celular, similar a lo que ocurre en las CPH de SPM<sup>79,101</sup> mientras que la expresión de p21, la ciclina D y CDK4 aumentan conforme aumenta el grado de diferenciación. De igual manera se ha observado que en cultivos prolongados, se pierde la capacidad de las CTH y se ha demostrado una baja participación de p16 y p19, lo que indica que mecanismos independientes de estas moléculas, juegan papeles dominantes en las CTH durante el cultivo.<sup>102</sup>

Por otra parte, se determinó, que la ausencia de p18 en CTH de un modelo de trasplante de ratón, se induce un incremento en las divisiones de autorrenovación y se incrementa el injerto a largo plazo, sugiriendo que p18 es un fuerte inhibidor limitante del potencial de autorrenovación de las CTH *in vivo*;<sup>103</sup> y en células humanas se observó que la ausencia de p18, disminuye la pérdida de las células que son negativas para p21.<sup>104</sup>

La presencia de algunos inhibidores de la hematopoyesis tales como el TGF- $\beta$ , reducen la expresión de receptores de citocinas en la membrana celular, tales como el receptor de la Interleucina-6 (RIL-6), receptor de c-Kit, del Receptor del ligado de FLT3 y el receptor de Eritropoyetina (REpo), y promueve el incremento en la proteína p21, y de forma conjunta inducen el arresto del ciclo celular, al tiempo que disminuye la capacidad proliferativa y se mantiene a las CTH y CPH humanas en las fases G0-G1.<sup>79,105</sup>

En células precursoras hematopoyéticas CD34+ humanas, ha observado que la sola presencia de un anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1 en el cultivo, induce sobre-expresión de p27, sin alguna modificación significativa en el estado del ciclo celular y su capacidad de proliferación a corto plazo. Lo que demostró la participación del TGF- $\beta$  en los mecanismos autocrinos de la regulación de la población de CTH así como, el papel de p27 (en altos niveles de expresión) en la inducción prematura a la diferenciación de progenitores, y la posible contribución a la pérdida del potencial de los precursores hematopoyéticos.<sup>106</sup>

Durante el cultivo de células CD34+ normales, se induce la diferenciación de granulocitos y megacariocitos, pero no de linaje eritroide, se ha detectado la presencia de p15, este nivel de expresión se incrementa conforme avanza el grado de maduración de las células.<sup>107</sup>

## Conclusiones

El ciclo celular es un proceso importante en todos los tipos celulares, ya que de este dependen muchas de las funciones

vitales de los diferentes tejidos que se encuentran en los organismos. En el ciclo celular están implícitas un gran número de moléculas, y de acuerdo con niveles estequiométricos, su presencia puede jugar papeles importantes en los procesos de proliferación, diferenciación, maduración e incluso apoptosis. No obstante, la pérdida del balance entre los niveles de expresión, fosforilación translocación al núcleo y degradación, pueden provocar alteraciones en la tasa proliferativa de las células en los diferentes tejidos donde esto ocurra.

Es interesante saber que a pesar de las diferentes funciones encontradas de algunas de las moléculas involucradas en este proceso. No todas actúan de igual forma, ya que como se ha observado en el sistema hematopoyético, las moléculas como p21 o p27 pueden tener funciones diferentes a las que en un inicio fueron caracterizadas. Esto implica procesos de proliferación, diferenciación o maduración. Tales comportamientos van a depender del tipo celular, las características de las células en donde se realizan dichos análisis, como el estado de diferenciación y madurez de las células, o bien de acuerdo con las condiciones del medio.

Sin embargo, el conocer algunos de los aspectos relacionados al ciclo celular en las CTH y CPH, ayuda a entender un poco más acerca de la biología de estas células a lo largo de todo el proceso hematopoyético, y nos proporciona herramientas para su manipulación que puedan ayudarnos a aplicar alternativas terapéuticas en procesos expansión, y proliferación para fines de trasplante y regeneración hematopoyética.

## Referencias

- Murray A, y Hunt T. The cell cycle. An Introduction, Oxford University Press. 1993.
- Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:295-312.
- Israels ED, Israels LG. The Cell cycle. *Stem Cells* 2001;19:88-91.
- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews* 2001;1:222-231.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;24:4876-4882.
- Russell P, y Nurse P. *Shizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided. *Cell* 1986; 45:781-782.
- Malumbres M, Barbacid M. Mammalia cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci* 2005;30:630-41.
- Conget PA, Mingell JJ. Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Exp Hematol* 2000;28:382-90.
- Alemet E, Kiyokawa H, Kaidis P. Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat. Cell Biol* 2005;7:831-836.
- Malumbres M, Sotillo R, Santamaría D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, et al. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 2004;118:493-504.
- Ren S, Rollins BJ. Cyclin/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell* 2004;117:239-251.
- Lilja L, Johansson JU, Gromada J, Mandic SA, Fried G, Berggeren PO, et al. Cyclin-dependent kinase 5 associated with p39 promotes Munc18-1 phosphorylation and Ca(2+) dependent exocytosis. *J. Biol Chem* 2004;279:29534-29541.
- Zhang L, Gjoerup O, Roberts TM. Serine/threonine kinase cyclin G-associated kinase regulates epidermal growth factor receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2004;101:10296-10301.
- Lolli G, Johnson LN. CAK-cyclin-dependent activating kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* 2005;4:572-577.
- Akoulitchev S, Chulkov S, Reinberg D. TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* 2000;407:102-106.
- Garriga J, Graña X. Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene* 2004;337:15-23.
- Kasten M, Giordano A. Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* 2001;20:1832-1838.
- Loyer P, Trembley JH, Katona R, Kidd VJ, Lahti JM. Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell. Signal.* 2005;17:1033-1051.
- Roberts M.J. Evolving ideas about cyclins. *Cell* 1999;98:129-132.
- Evans T, Rosenthal ET, Younglom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 1983;33:389-396.
- Hunt T. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr. Opin. Cell Biol* 1989;1:268-274.
- Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990;344:503-508.
- Xlog Y, Beach D. Population explosion in the cyclin family. *Curr. Biol* 1991;1:362-364.
- Peter M. The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Prog Cell Cycle Res* 1997;3:99-108.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707.
- Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994;371:257-261.
- Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, et al. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994;8:2939-2952.
- Chan FK, Zhang L, Chen L, Shapiro DN, Winoto A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol. Cell. Biol* 1995;15:2682-2688.
- Parry D, Mahony D, Willis K, Lees E. Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. *Mol. Cell. Biol* 1999;19:1775-1783.
- Thullberg M, Bartkova J, Khan S, Hansen K, Ronnstrand L, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Distinct versus redundant properties among members of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors. *FEBS Lett* 2000;470:161-166.
- Jeffrey PD, Tong L, Pavletich NP. Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev* 2000;14:3115-3125.
- Ly Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 1994;54:6078-6082.
- Gu Y, Turk CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993;366:634-635.
- Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res* 1994;211:90-98.
- Pollak K, Kato J, Solomon MJ, Ser CJ, Massague J, Roberts JM, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994;8:9-22.
- Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parquer S, Zhang P, Baldini A, et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995;9:650-662.
- Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 1995;374:386-388.
- Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massague J, Pavletich NP. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 1996;382:325-331.
- Pei XH, Xlog Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 2005;24:2787-2795.
- Feng XH, Lin X, Derinck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15 (Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J* 2000;19:5178-5193.
- Nevls JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* 1998;9:585-593.
- Cam H, Dynlacht BD. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* 2003;3:311-316.
- Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998;12:2245-2262.
- Aslanian A, Jaquinta PJ, Verona R, Lees JA. Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes Dev* 2004;14:13-1422.
- Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002;3:11-20.
- Kherrouche Z, De Launoit Y, Monte D. Human E2F6 is alternatively spliced to generate multiple protein isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2004;317:749-760.
- Tsal KY, HY, Macleof KF, Crowley DY, Yamasaki L, Jacks T. Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol Cell* 1998;2:293-304.
- Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2817-2822.
- Zhao J, Kennedy BK, Lawrence BD, Barbie DA, Matera AG, Fletcher JA, Harlow E. NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene. *Genes Dev* 2000;14:2283-2297.

50. Zhao J, Dynlacht B, Imai T, Hori T, Harlow W. Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes Dev* 1998;12:456-461.
51. Bouchar C, Staller P, Eilers M. Control of cell proliferation by Myc. *Trends in Cell Biology* 1998;8:202-206.
52. Nasi S, Clarapica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L. Making decisions through Myc. *FEBS Letters* 2001;490:153-162.
53. Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of cell cycle. *Cell Cycle* 2002;2:103-110.
54. Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:835-842.
55. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. New York U.S.A., 1994.
56. Marshall MS. Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 1995;9:1311-1318.
57. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 1996;271:20608-20616.
58. Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Roussel MF. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1091-1096.
59. Gollas CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004;12:1134-1141.
60. Nasheuer HP, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weissshark K. Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002;72:41-91.
61. Iizuka M, Stillma B. Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* 1999;274:23027-23034.
62. Findelsen M, E1-Denary M, Kapitza T, Graf R, Strausfeld U. Cyclin A-dependent kinase activity affects chromatin binding of ORC, Cdc6 and MCM in egg extracts of *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem* 1999;264:415-426.
63. Ishimi Y. A DNA helicase activity is associated with a MCM4, -6 and 7 protein complex. *J Biol Chem* 1997;272:24508-24513.
64. Sanchez I, Dylacht BC. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:311-321.
65. Ferby I, Blazquez M, Palmer A, Eritja R, Nebreda AR. A novel p34 (cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G(2)/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev* 1999;13:2177-2189.
66. Ookata K, Hisanaga S, Okumura E, Kishimoto T. Association of p34cdc2/cyclin B complex with microtubules in star fish oocytes. *J Cell Sci* 1993;105:873-881.
67. Mayani H, Gullbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992;34:49:225-233.
68. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A Newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID repopulating activity. *Nat Med* 1998;4:1038-1045.
69. Morrison SJ, Wright DE, Cheshier SH, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Curr Opin Immunol* 1997;216-221.
70. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P. Biology of human hematopoietic stem and hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res* 2003;476-488.
71. Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27<sup>Kip1</sup>. *Nature Med* 2000;6:1235-1240.
72. Rosedahl M, Adam J. Haemopoiesis by clonal succession? *Blood Cells* 1984;10:473-485.
73. Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 2002;100:4266-4271.
74. Serr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-1163.
75. Taniguchi T, Endo H, Chikatsu N, Uchimaru K, Asano S, Fujita T, et al. Expression of p21 (Cip1/Waf1/Sdi1) and p27 (kip) cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* 1999;93:4167-4178.
76. Tschan MP, Peters UR, Cajot JF, Betticher DC, Fey MF, Tobler A. The cyclin-dependent kinase inhibitors p18INK4c and p19INK4d are highly expressed in CD34+ progenitor and acute myeloid leukaemic cells but not in normal differentiated myeloid cells. *Br J Haematol* 1999;106:644-651.
77. Yaroslavskiy B, Watkins S, Doneberg AD, Patto TJ, Steinman RA. Subcellular and cell-cycle expression profiles of CDK-inhibitors in normal differentiating myeloid cells. *Blood* 1999;93:2907-2917.
78. Marone M, Pierelli L, Mozzetti S, Mascullio V, Boanno G, Morosetti R, Rutella S, Battaglia A, Rumi C, Mancuso S, Leone G, Giordano A, Scambia G. High cyclin-dependent kinase inhibitors in Bcl-2 and Bcl-xL-expressing CD34+ proliferating haematopoietic progenitors. *Br J Haematol* 2000;110:654-662.
79. Ducos K, Panterne B, Fortunel F, Hatzfeld A, Monier MN, Hatzfeld J. p21 (cip1) mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic cells. *J Cell Physiol* 2000;184:80-85.
80. Stier S, Cheng T, Forkert R, Lutz C, Dombkowski DM, Zhang JL, Scadden DT. Ex vivo targeting of p21 Cip/Waf1 permits relative expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;1260-1266.
81. Summers YJ, Heyworth CM, Wynter EA, Chang J, Testa NG. Cord blood G0 CD34+ cells have a thousand-fold higher capacity for generating progenitors in vitro than G1 CD34+ cells. *Stem Cells* 2001;19:505-513.
82. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998;16:153-165.
83. Lewis ID, Verfaillie CM. Multi-lineage expansion potential of hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 2000;28:1087-1095.
84. Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradkey A, et al. p53 independent expression of p21 Cip 1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 1995;1024-1027.
85. Durand B, Gao FB, Raff M. Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *EMBO J* 1997;16:306-317.
86. Mantel C, Luo Z, Cafield J, Braun S, Deng C, Broxmeyer HE. Involvement of p21 cip-1 and p27 kip-1 in the molecular mechanisms of steel factor-induced proliferative synergy in vitro and of p21 cip-1 in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo. *Blood* 1996;88:3710-3719.
87. Zeng YX, e-Deiry WS. Regulation of p21 WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene*. 1996;12:1557-1564.
88. Zhang W, Grasso L, McClain CD, Gambel AM, Cha Y, Travali S, et al. p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Research* 1995;55:668-674.
89. Steinman RA, Lu Y, Yaroslavskiy B, Stehle C. Cell cycle-independent up-regulation of p27Kip1 by p21Waf1 in K562 cells. *Oncogene*. 2001;20:6524-6530.
90. Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, el-Houseini ME. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 1994;11:3389-3396.
91. Matsumura I, Ishikawa J, Nakajima K, Oritani K, Tomiyama Y, Miyagawa J, et al. Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21 (WAF/CIP1) by Stat5. *Mol Cell Biol* 1997;17:2933-2943.
92. Kikuchi I, Furukawa Y, Iwase S, Terui Y, Nakamura M, Kitagawa S, et al. Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation: involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization. *Blood* 1997;89:3980-3990.
93. Uchimaru K, Taniguchi T, Yoshikawa M, Fujinuma H, Fujita T, Motokura T. Growth arrest associated with 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced hematopoietic differentiation with a defective retinoblastoma tumor suppressor-mediated pathway. *Leukemia Research* 1998;22:413-420.
94. Matsuoka M, Nishimoto I, Asano S. Interferon-β impairs physiologic down-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor, p27<sup>Kip1</sup>, during G1 phase progression in macrophages. *Exp. Hematol* 1999;27:203-209.
95. Tamir A, Petrocelli T, Stetler K, Chu W, Howard J, Croix BS, et al. Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: a role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest. *Cell Growth Differentiation* 2000;11:269-277.
96. Ghanem L, Steinman RA. p21Waf1 inhibits granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells. *Leuk Res* 2006; (Epub ahead of print).
97. Steinman RA, Huang J, Yaroslavskiy B, Goff JP, Ball ED, Nguyen A. Regulation of p21 (WAF1) expression during normal myeloid differentiation. *Blood* 1998;91:4531-4542.
98. Baccini V, Roy L, Vitrat N, Chagraoui H, Sabri S, Le Couedic JP, et al. Role of p21 (Cip1/Waf1) in cell cycle exit of endomitotic megakaryocytes. *Blood* 2001;98:3274-3282.
99. Steinman RA, Yaroslavskiy B, Goff JP, Alber SM, Watkins S. Cdk-inhibitors and exit from quiescence in primitive haematopoietic cell subsets. *Br. J. Haematol.* 2004;3:358-365.
100. Walkley CR, Fero ML, Chien WM, Purton LE, McArthur GA. Negative cell-cycle regulators cooperatively control self-renewal and differentiation of haematopoietic. *Nat Cell Biol* 2005;2:172-178.
101. Furukawa Y, Kikuchi J, Nakamura M, Iwase S, Yamada H, Matsuda M. Lineage specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoietic cell differentiation. *Br. J. Haematol* 2000;110:663-673.
102. Stepanova L, Sorrentino BP. A limited role for p16<sup>Ink4a</sup> and p19<sup>Arf</sup> in the loss of hematopoietic stem cells. *Blood* 2005;106:827-832.
103. Yu H, Yuan Y, Shen H, Cheng T. Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18INK4C and p21/Cip1/Waf1 in opposite manners. *Blood* 2006;3:1200-1206.
104. Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol.* 2004;5:436-442.
105. Fortunel NO, Hatzfeld JA, Monier MN, Hatzfeld A. Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor-beta. *Oncol. Res* 2003;13:445-453.
106. Pierelli L, Marone M, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Morosetti R, et al. Modulation of bcl-2 and p27 in human primitive proliferating hematopoietic progenitors by autocrine TGF-β1 is a cell cycle-independent effect and influences their hematopoietic potential. *Blood* 2000;95:3001-3010.
107. Teofilii L, Morosetti R, Martini M, Urbano R, Putzulu R, Rutella S, et al. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p15<sup>Ink4B</sup> during normal and leukemic myeloid differentiation. *Exp Hematol* 2000;28:519-526.