



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UMAE ESPECIALIDADES "DR. ANTONIO FRAGA MOURET"  
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

# TESIS

**Relación de la expresión de NOTCH1 en células troncales  
hematopoyéticas y el tiempo de injerto en pacientes sometidos a  
trasplante de células progenitoras.**

PARA OBTENER GRADO DE ESPECIALISTA EN:

## HEMATOLOGÍA

PRESENTA:

Dra. Ana Xóchitl Muñoz Gutiérrez

ASESOR:

Dr. Jorge Vela Ojeda

Dra. Laura Arcelia Montiel Cervantes



CIUDAD DE MEXICO, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**HOJA DE AUTORIZACION DE TESIS**

---

**DR JESUS ARENAS OSUNA**

**Jefe de División de Educación en Salud del HECMN La Raza.**

---

**DR JORGE VELA OJEDA**

**Profesor Titular del Curso Universitario de Hematología (UNAM)**

---

**DRA. ANA XOCHITL MUÑOZ GUTIERREZ**

**Residente de Cuarto Año de la Especialidad de Hematología**

**Núm. de registro**

**R- 2019-3501-020**

**Relación de la expresión de NOTCH1 en células troncales hematopoyéticas y el tiempo de injerto en pacientes sometidos a trasplante de células progenitoras.**

1. RESUMEN .....	4
2. SUMMARY .....	5
3. ANTECEDENTES .....	6
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSIÓN.....	22
7. CONCLUSIONES .....	24
8. BIBLIOGRAFÍA .....	25
9. ANEXOS .....	27

## RESUMEN.

**ANTECEDENTES:** La vía de señalización Notch1 está involucrada en el control de diversos eventos durante el desarrollo de las células eucarióticas como son la proliferación, el crecimiento, la migración, la diferenciación y apoptosis, es esencial para la generación de la *stem cell* hematopoyética como un componente importante del nicho hematopoyético que mantiene su regulación.

**MATERIAL Y METODOS:** Se realizó un estudio observacional, ambispectivo, transversal, comparativo, abierto, de los pacientes del departamento de Hematología que fueron sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas autólogo vs alogénico. Análisis estadístico: Se comparó la expresión de NOTCH1 en ambos grupos, así como su relación con el tiempo de injerto de neutrófilos, plaquetas, y el tiempo promedio (neutrófilos +plaquetas) utilizando medidas de tendencia central, y T de student.

**RESULTADOS:** Se analizaron 39 pacientes pos-trasplante en dos grupos con determinaciones de células NOTCH1, y se compararon la expresión de esto en relación al tiempo de injerto. No se encontró una diferencia significativa en la expresión CD34 y CD34/NOTCH 1 ( $p=0.5$ ) entre ambos grupos, así como entre la expresión CD34/NOTCH 1 y el tiempo promedio de injerto ( $p=0.78$ ), el injerto de plaquetas ( $p=0.46$ ), y el injerto de neutrófilos (0.82).

**CONCLUSIONES:** No se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de NOTCH1 entre los pacientes con trasplante autólogo vs alogénico por lo que se concluye que la expresión de NOTCH1 no modifica el tiempo de injerto en los pacientes.

**Palabras clave:** trasplante autólogo, trasplante alogénico, NOTCH1, Injerto.

## SUMMARY.

**BACKGROUND:** The Notch signaling pathway is involved in the control of various events during the development of eukaryotic cells such as proliferation, growth, migration, differentiation and apoptosis, it is essential for the generation of the hematopoietic stem cell as a important component of the hematopoietic niche that maintains its regulation.

**MATERIAL AND METHODS:** An observational, ambispective, cross-sectional, comparative, and open study of the patients of the Department of Hematology who underwent autologous versus allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation was performed. **Statistical analysis:** The expression of NOTCH1 was compared in both groups, as well as its relationship with neutrophil graft time, platelets, and average time (neutrophils + platelets) using measures of central tendency, and student's T.

**RESULTS:** Thirty-nine post-transplant patients were analyzed in two groups with determinations of NOTCH1 cells, and the expression of this in relation to graft time was compared. No significant difference was found in CD34 and CD34 / NOTCH 1 expression ( $p = 0.5$ ) between both groups, as well as between CD34 / NOTCH 1 expression and mean graft time ( $p = 0.78$ ), platelet graft ( $p = 0.46$ ), and neutrophil graft (0.82).

**CONCLUSIONS:** We did not find a statistically significant difference in the expression of NOTCH1 between patients with autologous transplantation vs allogeneic transplant, so it is concluded that the expression of NOTCH1 does not modify the graft time in patients.

**Key words:** autologous transplant, allogeneic transplant, CD34 / CD34 NOTCH, graft.

## ANTECEDENTES

La familia de receptores Notch consta de 4 proteínas transmembranales (Notch1 – 4) de un solo dominio que se unen a uno de los 5 ligandos (Jagged1, Jagged 2, Delta like 1, Delta like 3 y Delta like 4), siendo también estos últimos proteínas transmembranales de un solo dominio. Se considera a Notch un sistema de señalización altamente conservado que permite la comunicación celular, controla múltiples aspectos de biología celular, incluidos diferenciación, proliferación y apoptosis. Fue descubierto por THOMAS HUNT Morgan en 1917, en una mosca mutante. El papel de NOTCH ha sido bien caracterizado en el desarrollo de diferentes tejidos así como en el proceso de hematopoyesis y angiogénesis<sup>[1]</sup>

En mamíferos, la señalización de NOTCH se inicia por la interacción de los receptores NOTCH (Notch1– 4) con los ligandos de la Jagged (Jagged1–2) y familias de tipo Delta (DII1, DII3 y DII4). Los receptores son necesarios para el reconocimiento del ligando y, por lo tanto, para la función del receptor. Los receptores son modulados adicionalmente por la actividad de la familia Fringe glicosiltransferasas, que regulan su afinidad de unión a los ligandos individuales de NOTCH. Las interacciones receptor-ligando de NOTCH generan una fuerza física que desenmascara un sitio proteolítico de dominio extracelular, permitiendo la escisión por una desintegrina y metaloproteinasa (ADAM10). Este proceso conduce rápidamente a proteólisis dentro del dominio transmembrana por el complejo  $\gamma$ -secretasa, liberando muesca intracelular (ICN), el cual se traslada al núcleo donde se une a CSL / RBP-Jk (CBF-1, supresor de sin pelo, Lag-1; también llamado RBP-Jk y codificado por el gen Rbpj). ICN actúa como un activador transcripcional que interactúa con CSL / RBP-Jk y recluta a un coactivador transcripcional de familia similar a Mastermind (MAML), que conduce al gen objeto de activación.

En conjunto, la señalización de NOTCH conecta las señales de la superficie celular inducidas por múltiples ligandos de NOTCH y receptores a una vía común de activación

transcripcional "canónica" mediada por ICN, CSL y MAML en el núcleo de un gran complejo multiprotéico [2]

El Sistema humano de NOTCH consiste en 5 ligandos y 4 receptores de membrana, esta señalización es importante para la regulación de la hematopoyesis normal y neoplásica, desarrollo del sistema inmune celular y regulación de la respuesta inmune. [3]

En varios estudios de trasplante la reconstitución a largo plazo de la *stem cell* mostró estar alterada si se inhibía la señalización de NOTCH 1. En un estudio de Maillard et al. Se bloqueó la señalización de NOTCH, por eliminación de CBF1 y se encontró que la señalización canónica de NOTCH era indispensable para mantener a la *stem cell* a largo plazo *in vivo* [3]

Las células endoteliales promueven la expansión de las *stem cell* y su auto renovación *in vitro*, y se ha mostrado que tiene un papel importante en el injerto de las *stem cell* y la reconstitución de la hematopoyesis *in vivo*. La regeneración de la hematopoyesis después de una mieloablación es dependiente de la recuperación vascular y de la función celular endotelial, NOTCH se ha implicado en las interacciones célula- célula entre las *stem cell* y las células endoteliales que regulan la función de las primeras [3]

La señalización de NOTCH1 es esencial para la generación de la *stem cell* hematopoyética definitiva durante la embriogénesis y para los adultos en el mantenimiento del *pool*. Se cree que este sistema de proteínas de NOTCH1 es parte importante en la vía señalización encargada del mantenimiento y expansión del mismo, en adición tiene un papel en la señalización en osteoblastos y homeostasis de osteoclastos. Los progenitores expresan receptores de NOTCH 1 y son expuestos a ligandos del mismo en medula ósea, como son la expresión de JAG1 y DLL1 por osteoblastos. En un estudio por Calvi *et al*, la estimulación con hormona paratiroidea de ratones resultó en aumento en proliferación de osteoblastos, e incremento en la expansión de las *stem cell* mediada por NOTCH 1. Estas observaciones identificaron a NOTCH como un componente importante del nicho hematopoyético que mantiene la regulación osteoblástica de la *stem cell*.

Las células endoteliales de la medula ósea expresan ligandos de NOTCH y su expresión puede ser regulada por estímulos pro inflamatorios *in vitro* e *in vivo*. En un estudio por Fernández y colaboradores, una línea celular endotelial llamada BMS (bone marrow endotelial cells) junto con las células endoteliales primarias, expresaban ligandos de jagged (dependientes de NOTCH). La capacidad de estas células de expandir los progenitores hematopoyéticos en un cultivo *in vitro* fue dependiente de la señalización de NOTCH, estos autores demostraron que la densidad de ligandos y la intensidad de la señalización de NOTCH resulta en diferentes grados de expansión de las células troncales hematopoyéticas <sup>[4]</sup>. *In vivo* las citocinas pro inflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa, causaron un incremento en la expresión de jagged 2 en las células endoteliales y de receptores de NOTCH 1 Y NOTCH 2 en los progenitores hematopoyéticos los cuales se asociaron con aumento en la activación de NOTCH <sup>[3]</sup>

Además la molécula de señalización NOTCH es importante para el auto renovación de las células madre y la determinación del destino en muchos tejidos, incluido el sistema hematopoyético. Sin embargo, el papel preciso y la importancia fisiológica de los receptores NOTCH, ya sea como moléculas de adhesión y / o señalización, en la homeostasis de la célula progenitora hematopoyética así como su función todavía no se entiende completamente <sup>[5]</sup>

El papel de la señalización de Notch en la malignidad se informó por primera vez en 1991 cuando el locus previamente no caracterizado en una t (7; 9) (q34;q34.3) translocación cromosómica de un caso de leucemia linfoblástica T humana (T-ALL) contenía un gen altamente homólogo al gen NOTCH de *Drosophila*, más tarde denominado NOTCH-1. Este daño resulta en la presencia de una proteína NOTCH-1 truncada con la capacidad de conducir la transformación oncogénica en células renales de rata *in vitro*. Cuando la proteína truncada fue detectada en más de El 65% de todos los pacientes con LLA de estirpe T, la vía de NOTCH surgió como una Impulsor clave del desarrollo de la misma. Desde entonces, se le atribuye propiedades oncogénicas y supresoras de tumores <sup>[6]</sup>

Se ha informado que el tratamiento previo con el anticuerpo bloqueador NOTCH 2 sensibiliza a HSPC a los estímulos movilizadores de G-CSF y AMD3100 con un

aumento de 3 a 4 veces en la movilización sin afectar la homeostasis y auto-renovación de la *stem cell* de médula ósea en general. Además, se demuestra que la señalización de NOTCH regula directamente la expresión de CXCR4 y, por lo tanto, el bloqueo transitorio de Notch2 disminuye la concentración de CXCR4 y aumenta el ciclo celular. De acuerdo con estos hallazgos, el bloqueo transitorio de Notch 2 conduce a un mayor inicio de *stem cell* a la médula ósea y a una ventaja competitiva de repoblación de los progenitores con una mejor recuperación de los elementos hematopoyéticos. Para examinar los efectos del bloqueo de señalización de NOTCH en la salida de células madre hematopoyéticas, se realizó un estudio en el que se aplicó el anticuerpo de bloqueo NOTCH o el anticuerpo de control de tipo a ratones de tipo salvaje (Nativo). El bloqueo de señalización de NOTCH 2 transitorio promueve la salida de células madre hematopoyéticas en respuesta a la movilización de reactivos. Una dosis única de anti-Notch2 seguida de G-CSF o AMD3100 dio como resultado un 56% y 111% aumento en el recuento de glóbulos blancos (GB) en comparación con cualquier reactivo solo. Sin embargo en este estudio no se observó ningún cambio significativo en las células troncales hematopoyéticas circulantes en ratones que recibieron anti-Notch1 [5]

El impacto exacto de la señalización mediada por NOTCH en la génesis de tumores está justificado y es probable que guíe el desarrollo de agentes específicos contra el cáncer más potente, dentro de esta nueva era de medicina con tratamientos dirigidos. [6]

Se sabe además que la hiperactivación de la ruta NOTCH induce muchos genes, incluido el factor de transcripción oncogénico Myc y el represor transcripcional Hes 1, cada uno requerido para la leucemogénesis de células T dirigida por ICN1 en ratones. La frecuencia de activación de la ruta NOTCH en ALL T en humanos sugiere varias estrategias para una intervención terapéutica dirigida. [7]

Más del 50% de las líneas de células ALL T humanas muestran mutaciones NOTCH 1 "activadoras", aunque estudios más recientes sugieren que estas mutaciones pueden no ser suficientes para el desarrollo de la misma, esto nos ofrece un panorama sobre la patogénesis y las implicaciones de esta vía en el proceso de la fisiopatología de la

enfermedad, y por lo tanto pudiera ser útil como un factor pronóstico en los pacientes pos trasplantados. [7]

La señalización de NOTCH es un determinante importante del mantenimiento de las células madre en muchos cánceres diferentes. Las células madre están ubicadas en un nicho dependiente del contexto de los componentes del microambiente tumoral. Esta observación está respaldada por observaciones *in vitro* en tumores que muestran que la señalización se activa en las células cancerosas por ligandos presentados por el nicho vascular. En diferentes configuraciones, Jag1 desempeña un papel importante en la interacción de las células madre del cáncer con el nicho. Por ejemplo, en los linfomas de células B, NOTCH refuerza el fenotipo agresivo y la resistencia a la quimioterapia. La señalización de NOTCH es, por lo tanto, una vía importante que media la interacción entre las células madre del cáncer y su nicho, no solo en la línea hematopoyética sino en varios tipos de cáncer [8]

En general, la transmisión de la señal de NOTCH implica esencialmente el contacto físico entre las células. Además, la activación de linfocitos T mediada por el receptor de células T también puede conducir a la liberación de ligando independiente de la señalización de NOTCH. Este mecanismo del procesamiento del receptor en la activación de NOTCH independiente del ligando, ha sido descrito para ser activado a través de señales internas de la célula. La señalización NOTCH no canónica se informó por primera vez en *Drosophila* por su papel en la guía de axones, la señalización NOTCH no canónica y no nuclear se produce en las células T para prevenir la pérdida de la función mitocondrial y el consiguiente daño nuclear para promover la supervivencia de las células [9]

Por otro lado la señalización de NOTCH tiene un papel en la mayoría de los órganos. Algunos de los órganos en los que la señalización NOTCH desregulada es vinculada a la enfermedad, podrían brindar oportunidades para la intervención terapéutica.

Actualmente, una limitación en el campo es la escasez de agentes, en particular anticuerpos específicos y buenos para cada uno de los receptores activados, para permitir una visualización eficiente de la señalización activa de NOTCH *in vivo*. Esto

restringe nuestra capacidad para medir niveles de activación de NOTCH en la actividad clínica. El Perfil de expresión génica puede proporcionar un enfoque alternativo para revelar la señalización de NOTCH activo, pero este método se complica por el hecho de que el transcripto parece ser bastante diverso a través de diferentes tipos de células.

En el sistema hematopoyético, NOTCH tiene roles críticos en diversos pasos de diferenciación en el sistema hematopoyético, influye en el desarrollo de células madre hematopoyéticas fetales, compromiso con el linaje linfoide, desarrollo, destino celular, y la decisión en los linajes mieloide y eritroide.

La señalización de NOTCH reducida en ratones se asocia con un aumento de la acumulación de progenitores de monocitos de granulocitos, que conduce a un fenotipo similar a la leucemia. NOTCH también ha sido implicado como un regulador de la regeneración hematopoyética, es por eso que se deduce que tiene un papel importante en el injerto de los pacientes posterior al trasplante de células troncales hematopoyéticas. Además, la pérdida de NOTCH 1 Y NOTCH 2 en la médula ósea conduce a un desorden mielo proliferativo o linfoproliferativo, pérdida de la autonomía celular, lo que sería una célula madre NO trasplantable <sup>[10]</sup>

Estas observaciones identificaron a Notch como un componente importante del nicho hematopoyético que mantiene la regulación osteoblástica de la *stem cell*. Es importante determinar si dichos hallazgos se replican en humanos, sobretodo en el contexto de los pacientes sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, conocer si la expresión de NOTCH1 influye en el tiempo de injerto en los pacientes sometidos a trasplante, ya que el mejor conocimiento sobre la biología de esta vía de señalización puede ser utilizado para desarrollar estrategias innovadoras para la selección de donantes, con el objetivo de mejorar el efecto del injerto, reducir días de estancia hospitalaria y por lo tanto costos en cuanto al trasplante de células troncales hematopoyéticas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio observacional, ambispectivo, transversal, comparativo, abierto, de los pacientes del departamento de Hematología con diagnóstico clínico, morfológico, inmunofenotípico y citoquímico de leucemia, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, Linfoma No Hodgkin, síndrome mielodisplásico y/o anemia aplásica, que fueron sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en el Hospital de Especialidades del CMN La Raza, bajo consentimiento informado, y como controles se utilizaron muestras de donadores clínicamente sanos pareados por edad y sexo, obtenidas de las cosechas de donadores de trasplante alogénico del servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del CMN La Raza del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza (HE CMNR) durante el periodo comprendido de Febrero del 2018 a febrero de 2019.

El objetivo principal del estudio fue determinar la expresión de NOTCH1 en las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de los pacientes con enfermedades hematológicas sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, y su relación con el tiempo de injerto.

**Selección de pacientes.** Se incluyeron a los pacientes con diagnóstico de diagnóstico clínico de leucemia, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, Linfoma No Hodgkin y anemia aplásica, derechohabientes del IMSS, mayores de 16 años que pertenecen a la clínica de trasplante del Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS. Que fueron sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, que firmaron la carta de consentimiento informado. No se incluyeron pacientes con pruebas serológicas positivas: VIH, TORCH, hepatitis B y C. Se eliminaron pacientes con la información de los expedientes clínicos incompletos y pacientes que retiraron el consentimiento informado.

Para el tamaño de la muestra se utilizó correlación entre dos variables numéricas: obteniendo una n de 14 por grupo, siendo en total 28 pacientes.

**Recolección de datos.** Se invitó a participar al estudio a todos los sujetos adscritos departamento de Hematología con diagnóstico de leucemia, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, Linfoma No Hodgkin, síndrome mielodisplásico y anemia aplásica, que fueron sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en el Hospital de Especialidades del CMN La Raza, durante el periodo de febrero del 2018 a enero del 2019, todos recibieron información oral y escrita acerca de las características del estudio, al firmar el consentimiento informado, se realizó la recolección de datos. Se incluyeron como controles las muestras de donadores clínicamente sanos, pareados, obtenidas de las cosechas de donadores de trasplante alogénico a quienes se realizó determinación de expresión de NOTCH 1 en CD 34+ mediante citometría de flujo.

**Análisis estadístico.** Se creó una base de datos con las características ya mencionadas de los pacientes para cada grupo analizado. Se realizaron medidas de tendencia central, Se compararán las medias o medianas de los niveles de expresión de NOTCH1 en las células CD34+ de pacientes sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (autólogo y alogénico) con la prueba t student, Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS versión 21 considerando una  $p < 0.05$  como significativo.

## RESULTADOS

Se analizaron muestras de 39 pacientes a quienes se trasplantaron con células progenitoras hematopoyéticas entre el 8 de febrero del 2018 y el 24 de enero del 2019, de los cuales el 53.8% fueron hombres, y el 46.2 % mujeres. La edad de los pacientes fue entre 19 y 70 años, con una media de 43.2 años (DE 1.50).

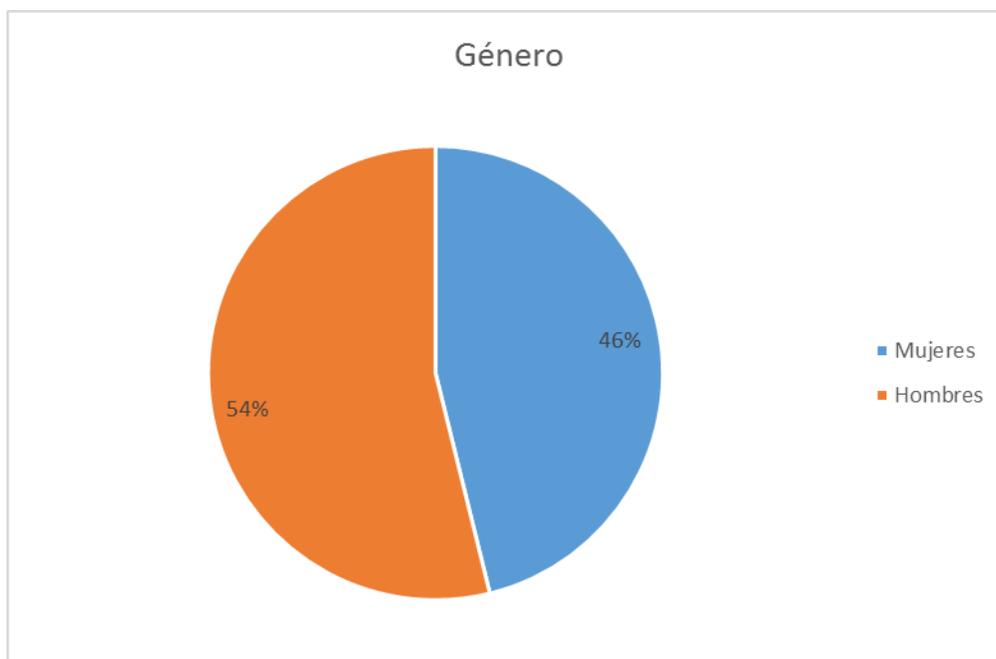


Figura 1. Distribución de pacientes por género.

Los diagnósticos más frecuentes por el cual se realizó el trasplante fueron mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin, ambos en 9 pacientes que representa el 23.1% de la muestra, respectivamente. El resto de los padecimientos por lo que recibieron el trasplante fueron: linfoma de Hodgkin en 6 pacientes (15.4%), anemia aplásica, leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda, cada una con 4 pacientes (10.3%), síndrome mielodisplásico en dos pacientes (5.1%), y leucemia mieloide aguda en un paciente (2.6%).

Tabla 1. Se resumen las variables demográficas

Variable	Frecuencia
<b>Sexo</b>	
Mujeres	18 (46.2%)
Hombres	21 (53.8%)
<b>Edad</b>	42.3 años (DE 1.5)
<b>Diagnósticos</b>	
Mieloma múltiple	9 (23.1%)
Linfoma No Hodgkin	9 (23.1%)
Linfoma Hodgkin	5 (15.4%)
Anemia aplásica	4 (10.3%)
Leucemia linfoide aguda	4 (10.3%)
Leucemia mieloide crónica	4 (10.3%)
Síndrome mielodisplásico	2 (5.1%)
Leucemia mieloide aguda	1 (2.6%)
<b>Tipo de trasplante</b>	
Autólogo	21 (53.8%)
Alogénico	19 (46.2%)
<b>Células CD34<sup>+</sup> Totales</b>	6.18x10 <sup>6</sup> /kg (DE 2.06)
<b>Células CD34<sup>+</sup> / NOTCH 1<sup>+</sup></b>	18.1% (DE 14.19)
<b>Células infundidas CD34<sup>+</sup> / NOTCH 1<sup>+</sup></b>	13,394.62 células/kg

	(DE 25,650.37).
<b>Tiempo para injerto</b>	
<b>Plaquetas</b>	11.1 días (DE 2.23)
<b>Neutrófilos</b>	12.7 días (DE 2.51)
<b>Promedio</b>	11.9 días (DE 1.96)

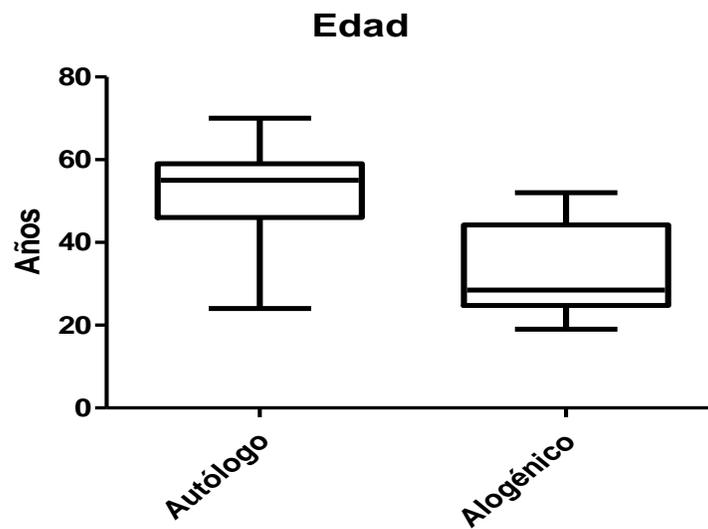


Figura 2. Edad de pacientes por tipo de trasplante

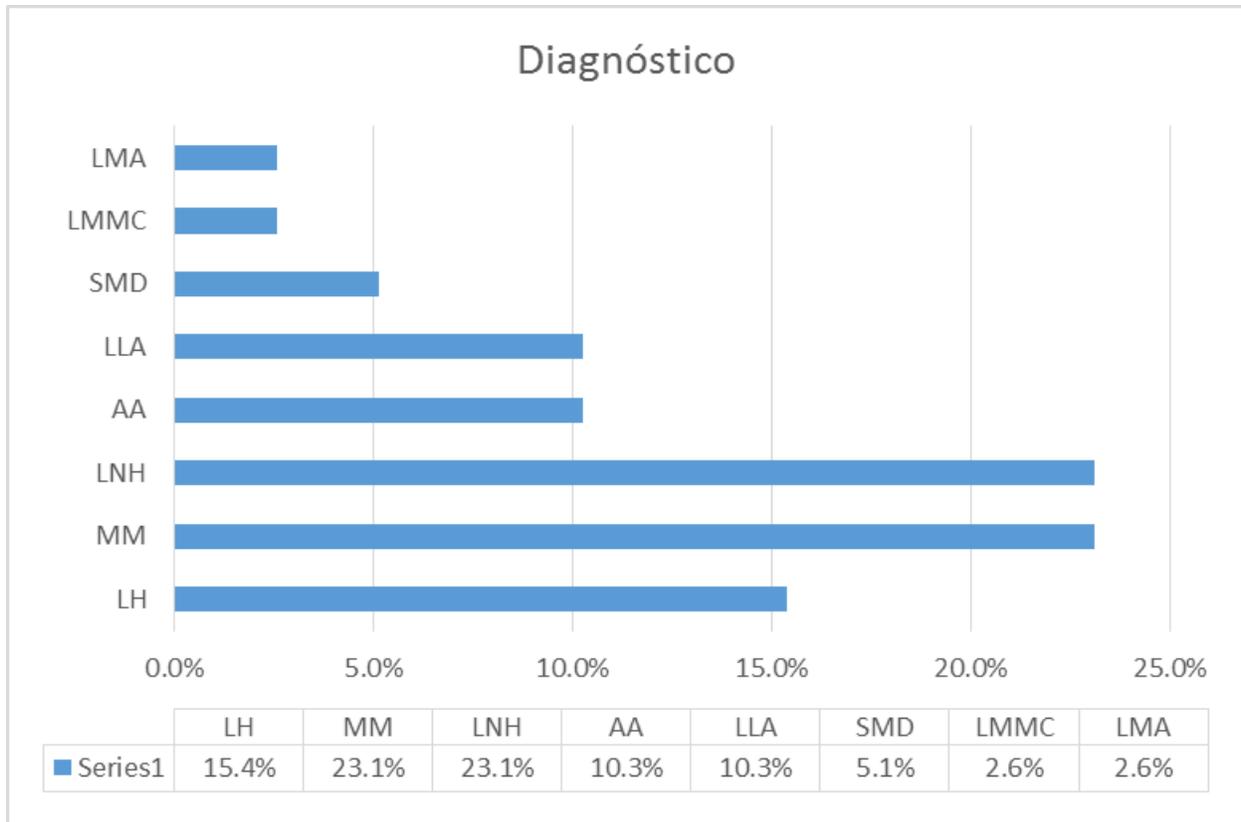


Figura 3. Principales diagnósticos en los pacientes sometidos a trasplante

En cuanto al tipo de trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, se realizó trasplante autólogo en el 53.8% de los pacientes, y alogénico en 46.2%. Las células progenitoras hematopoyéticas se cuantificaron por citometría de flujo con el marcador CD34+, de las muestras analizadas se cuantificaron entre  $2.06 \times 10^6/\text{kg}$  y  $24.52 \times 10^6/\text{kg}$ , con una media de  $6.18 \times 10^6/\text{kg}$  (DE 2.06). La expresión de NOTCH1 fue en promedio 18.1% (DE 14.19), con un mínimo de 1.7% y máximo de 60.7%. Fueron infundidas NOTCH 1+ entre 312.12 células/kg y 101,679.80 células/kg, con una media de 13,394.62 células/kg (DE 25,650.37). El tiempo promedio para injerto tuvo una media de 11.9 días (DE 1.96) con un mínimo de 8 días y máximo de 15.5 días, el tiempo para injerto de plaquetas tuvo una media de 11.1 días (DE 2.23) con valores entre 7 y 17 días, mientras que el tiempo de injerto de neutrófilos tuvo una media de 12.7 días (DE 2.51) con un mínimo de 7 días y máximo de 17 días.

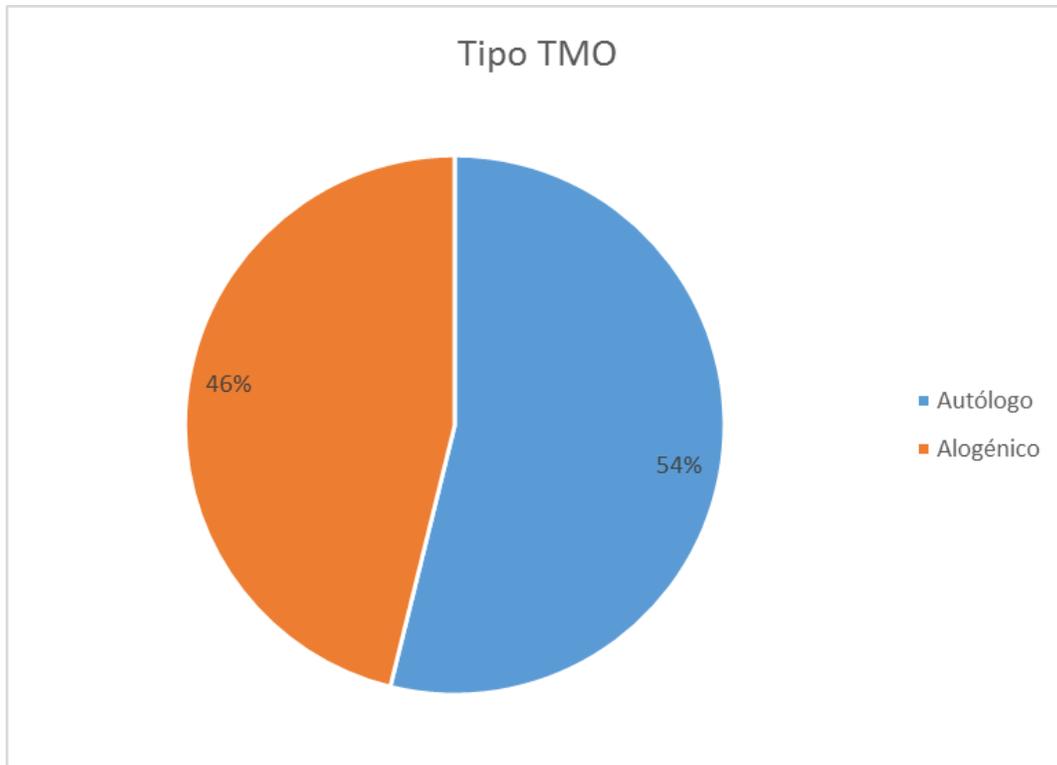


Figura 4. Tipos de trasplante

Los pacientes con trasplante autólogo se obtuvo una media de  $5.49 \times 10^6/\text{kg}$  (DE 4.7), y la expresión de NOTCH1 fue en promedio 20.1% (DE 16.7), con un mínimo de 1.7% y máximo de 49.32%. Fueron infundidas entre 312.12 células/kg y 54,419 células/kg, con una media de 9,360.1 células/kg (DE 20,256.18). El tiempo promedio para injerto tuvo una media de 11.19 días (DE 1.92) con un mínimo de 8 días y máximo de 14.5 días, el tiempo para injerto de plaquetas tuvo una media de 10.7 días (DE 2.4) con valores entre 7 y 17 días, mientras que el tiempo de injerto de neutrófilos tuvo una media de 11.6 días (DE 1.90) con un mínimo de 9 días y máximo de 15 días.

Por otra parte, los pacientes con trasplante alogénico se obtuvo una media de células infundidas CD34+ de  $6.98 \times 10^6/\text{kg}$  (DE 1.75), y la expresión de NOTCH1 fue en promedio 17.1% (DE 11.5), con un mínimo de 5.8% y máximo de 41.7%. Fueron infundidas entre 375.26 células/kg y 101,679.80 células/kg, con una media de 18,078.23 células/kg (DE 30,659.82). El tiempo promedio para injerto tuvo una media de 12.8 días (DE 1.68) con un mínimo de 9.5 días y máximo de 15.5 días, el tiempo

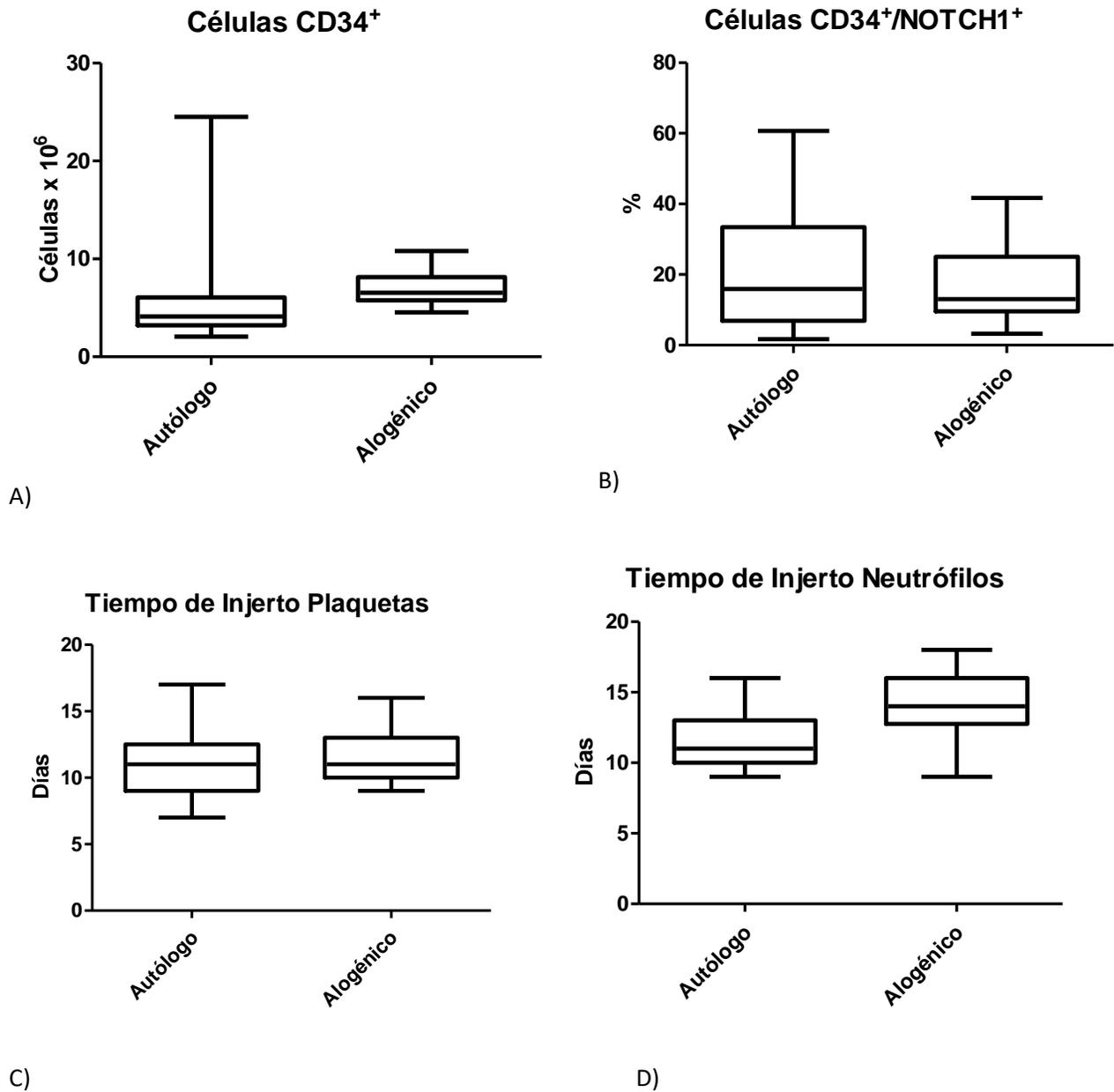
para injerto de plaquetas tuvo una media de 11.5 días (DE 2.0) con valores entre 9 y 15 días, mientras que el tiempo de injerto de neutrófilos tuvo una media de 14.1 días (DE 2.51) con un mínimo de 9 días y máximo de 18 días.

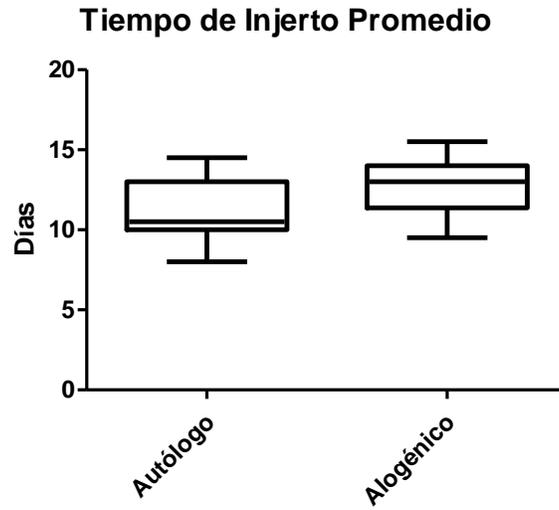
Tabla 2. CARACTERISTICAS EN TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

Variable	Autólogo	Alogénico	P
<b>Sexo</b>			
<b>Mujeres</b>	10 % (47.6)	9 (47.4%)	
<b>Hombres</b>	11 % (52,4)	10 (52.6%)	
<b>Edad</b>	50.9 años (DE 12.85)	32.2 años (DE 10.5)	< 0.001
<b>Células CD34<sup>+</sup> Totales</b>	5.49x10 <sup>6</sup> /kg (DE 4.73)	6.9x10 <sup>6</sup> /kg (DE 1.75)	0.2
<b>Células CD34<sup>+</sup> / NOTCH 1<sup>+</sup></b>	20.9% (DE 16.7)	17.1% (DE 11.5)	0.5
<b>Células infundidas</b>	9,380 células/kg (DE 20,254)	18,078 células/kg (DE 30,659)	0.2
<b>Tiempo para injerto</b>			
<b>Plaquetas</b>	10.76 días (DE 2.4)	11.5 días (DE 2.0)	0.3
<b>Neutrófilos</b>	11.6 días (DE 1.9)	14.1 días (DE 1.1.92)	0.001
<b>Promedio</b>	11.1 días (DE 1.96)	12.8 días (DE 1.68)	0.009

No se encontraron diferencias en la expresión de NOTCH1 en células CD34<sup>+</sup> entre los grupos. Se encontró que el tiempo de injerto en promedio fue menor en el grupo de trasplante autólogo encontrando una diferencias significativa (p 0.008), y menor tiempo de injerto de neutrófilos con una diferencias significativa (p 0.001), con respecto al

tiempo de injerto de plaquetas no se encontró diferencias entre los grupos ( $p=0.3$ ). No se encontró correlación entre la expresión de NOTCH1 y el tiempo promedio de injerto ( $p=0.78$ ), injerto de plaquetas ( $p=0.46$ ), ni injerto de neutrófilos (0.82).





E)

Figura 5. A) Expresión de células CD34 por grupo, B) Expresión de CD34+/NOTCH1+ por grupo, C) Tiempo de injerto de plaquetas por grupo, D) Tiempo de injerto de neutrófilos por grupo, E) Tiempo de injerto promedio (plaquetas + neutrófilos) por grupo.

## DISCUSIÓN

Como se encuentra documentado, la vía de señalización Notch está involucrada en el control de diversos eventos durante el desarrollo de las células eucarióticas como son la proliferación, el crecimiento, la migración, la diferenciación y la apoptosis. El sistema de ligando / receptor Notch es importante para el desarrollo y la regulación del sistema de células T y la regulación de la hematopoyesis normal y leucémica. Los efectos biológicos finales de la selección de Notch en receptores de células madre son difíciles de predecir. [3]. Notch es una molécula de señalización importante para el auto renovación de células madre y la determinación del destino en muchos tejidos. Incluyendo el sistema hematopoyético. Y se ha documentado que es importante para el mantenimiento de la inactividad del HSC y la correcta localización de nichos. [5]

Actualmente en el desarrollo de herramientas farmacológicas para selección de señalización mediada por Notch se considera a los receptores de trasplantes para estudios clínicos de estos agentes, esto debido a la difícil predicción de comportamiento de esta molécula de señalización [3] En este estudio se realizó la medición de NOTCH 1 por microlitro en 39 pacientes distribuidos en 2 grupos sometidos a trasplante de células progenitoras hematopoyéticas autólogo vs alogénico. Las células progenitoras hematopoyéticas se cuantificaron por citometría de flujo con los marcadores CD34 y NOTCH 1, de las muestras analizadas la expresión de NOTCH1 fue en promedio para ambos grupos de 18.1% (DE 14.19), y fueron infundidas una media de 13,394.62 células/kg (DE 25). Sin embargo el tiempo promedio para injerto tuvo una media de 11.19 días (DE 1.92) en el trasplante autólogo en comparación con media de 12.8 días (DE 1.68) para el trasplante alogénico. El tiempo para injerto de plaquetas tuvo una media de 10.7 días (DE 2.4) vs una media de 11.5 días (DE 2.0), mientras que el tiempo de injerto de neutrófilos tuvo una media de 11.6 días (DE 1.90) vs una media de 14.1 días (DE 2.51) en trasplante autólogo y trasplante alogénico respectivamente.

Estos hallazgos se comparan con el estudio de Delaney et al. En el cual demostraron que la expansión de células madre *ex vivo* redujo el tiempo hasta la reconstitución de los neutrófilos [3] Sin embargo al realizar el análisis estadístico con la prueba T de

Student, no se encontró una diferencia significativa en la expresión CD34 y NOTCH 1 ( $p=0.5$ ) entre ambos grupos, así como entre la expresión NOTCH 1 y el tiempo promedio de injerto ( $p=0.78$ ), el injerto de plaquetas ( $p=0.46$ ), y el injerto de neutrófilos (0.82).

Esto puede deberse a que la señalización inducida por Notch también es importante para la linfopoyesis T, la cual se comporta de manera diferente tanto en pacientes con trasplante autólogo, como en pacientes con trasplante alogénico, pero no se sabe si se pueden usar estrategias *ex vivo* o *in vivo* alternativas para la focalización de Notch para aumentar la linfopoyesis y acortar el tiempo hasta la reconstitución linfocítica y acortar así el efecto de CD4 postrasplante. Una estrategia de este tipo puede volverse útil en pacientes trasplantados para aumentar la reactividad de las células T anti leucémicas del trasplante (Autólogo), mientras que sería más difícil de usar en pacientes trasplantados con riesgo de EICH grave y potencialmente letal (alogénico). [3]

En nuestro estudio se encontró diferencia significativa en el tiempo de injerto promedio (neutrófilos + plaquetas), el cual fue menor en el grupo de trasplante autólogo ( $p 0.008$ ), y menor tiempo de injerto de neutrófilos con una diferencia significativa ( $p 0.001$ ), con respecto al tiempo de injerto de plaquetas no se encontró diferencias entre los grupos ( $p=0.3$ ). Dentro de las observaciones, se encontró que estos pacientes tuvieron una infusión de células con mayor expresión (más no en la cantidad de células infundidas) de NOTCH 1, 20.9% (DE 16.7) en autólogo vs 17.1% (DE 11.5), que si bien no tuvo una diferencia significativa ( $p=0.5$ ), puede ser la pauta para mejorar la estrategia de estudio, ya que las evidencias indican que el sistema de señalización Notch está frecuentemente desregulado en cáncer y, por lo tanto, la importancia de su función al controlar las decisiones del destino celular, incluyendo eventos en el desarrollo, renovación de células troncales y diferenciación en diversos tejidos, su modulación ofrece una nueva estrategia terapéutica, mismo que significa un campo de investigación prometedor para la industria biofarmacéutica en el desarrollo de agentes antineoplásicos, tales estudios deben ser alentados porque la selección de Notch puede representar una posibilidad única para combinar la mejora de la reconstitución, la inmunomodulación y el tratamiento directo contra el cáncer.[3] [6]

## CONCLUSIÓN

Al comparar la diferencia en la expresión de CD34 y NOTCH1 entre los pacientes con trasplante autólogo vs trasplante alogénico no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, por lo que se rechaza la hipótesis y se concluye que la expresión de NOTCH1 no modifica el tiempo de injerto en los pacientes. Se requiere de más estudios para poder identificar como factor pronóstico la expresión de NOTCH1 para el tiempo de injerto en ambos tipos de trasplante.

## BIBLIOGRAFIA

1. Gu Y, Masiero M, Banham A. NOTCH signaling: its roles and therapeutic potential in hematological malignancies. *Oncotarget* [internet].2016 [consultado el 28 noviembre 2018]; 7 (20): 29804–29823. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5045435/>
2. Radojcic V, Maillard I. Notch signaling and alloreactivity. *Transplantation* [internet]. 2016 [consultado el 30 de noviembre 2018]; 100 (12): 2593–2600. Disponible en: [https://journals.lww.com/transplantjournal/FullText/2016/12000/Notch\\_Signaling\\_and\\_Alloreactivity.22.aspx](https://journals.lww.com/transplantjournal/FullText/2016/12000/Notch_Signaling_and_Alloreactivity.22.aspx)
3. Ersvaer E, Hatfield K, Reikvam H, et al. Future Perspectives: Therapeutic Targeting of Notch Signalling May Become a Strategy in Patients Receiving Stem Cell Transplantation for Hematologic Malignancies. *Bone Marrow Res* [internet]. 2010[consultado 3 diciembre 2018]; 2011:1-15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22046566>
4. Pereira F, Gonzalez J, Anjos-Alfonso F, et al. NOTCH Signaling in the Regulation of hematopoietic Stem cell. *Curr stem Cell Rep* [internet]. 2017 [consultado el 2 diciembre2018]; 3(3) :202-209. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5548842/>
5. Wang W, Yu S, Myers J, et al. Notch2 blockade enhances hematopoietic stem cell mobilization and homing. *Haematologica* [internet].2017 [consultado 10 diciembre 2018]; 102 (10):1785-1795. Disponible en: <http://www.haematologica.org/content/102/10/1785.full.pdf+html>
6. Shubhada V, Chiplunkara D, Dimpu G. The multifaceted role of Notch signal in regulating T cell fate. *Immunology Letters* [internet].2019 [consultado 1 febrero 2019]; 206 (2019):59–64. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247818303912?via%3Dihub>

7. Witkowski MT, Cimmino L, Y Hu, et al. Activated Notch counteracts Ikaros tumor suppression in mouse and human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* [internet]. 2015 [consultado el 3 febrero 2019]; 29(6): 1301–1311. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25655195>
8. Inder S, O'Rourke S, McDermott N, et al. The Notch-3 receptor: A molecular switch to tumorigenesis?. *Cancer Treatment Reviews* [internet] 2017 [consultado 5 febrero 2019]; 60 (2017): 69–76. Disponible en: [https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372\(17\)30143-3/fulltext](https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372(17)30143-3/fulltext)
9. Doi K, Imai T, Kressler Ch. et al. Crucial role of the Rap G protein signalin Notch activation and Leukemogenicity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Scientific Reports* [internet].2015[consultado el 3 febrero 2019]; 5 (7978):1-8. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep07978.pdf>
10. Andersson ER, Lendahl U. Therapeutic modulation of Notch signalling are we there yet?. *Nat Rev Drug Discov* [internet]. 2014 [consultado 8 febrero 2019];13 (5): 357-78. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24781550>

**ANEXO I**

**HOJA DE CAPTURA DE DATOS:**

Nombre \_\_\_\_\_ NSS \_\_\_\_\_.

Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Diagnóstico inicial \_\_\_\_\_.

Tipo de trasplante: Autólogo \_\_\_\_\_ Alogénico \_\_\_\_\_

Número de recaídas \_\_\_\_\_.

Fecha de:  
Trasplante \_\_\_\_\_.

Fecha de:  
Injerto \_\_\_\_\_.

**RESULTADOS:**

CD34/NOTCH1 por  $\mu$ L \_\_\_\_\_

## **ANEXOII: FLUOROCITOMETRÍA ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Las muestras a analizar (cosecha de células mononucleares) provienen del procedimiento de aféresis llevado a cabo en el Banco de Sangre, en donde al donador de células se conecta a una máquina de aféresis que se programa para obtener las células mononucleares.

A partir de cada una de las muestras se les realizará cuantificación de células nucleadas en el equipo Advia 120 marca Siemens para ajustar la cantidad de células a  $10^6/100\mu\text{L}$  y poder realizar la tinción utilizando para esta cantidad de células  $20\mu\text{L}$  del anticuerpo en estudio. Inicialmente a todas las muestras se les realizarán estudios de inmunocitofluorometría para identificación de células CD34. Los anticuerpos monoclonales que se utilizaran para realizar la caracterización de las células son: CD 34 7AAD y el marcador de interés para este trabajo: NOTCH 1, además de todos los insumos necesarios para la tinción de superficie de acuerdo a el procedimiento establecido por el fabricante; todos los anticuerpos monoclonales serán de la marca Becton Dickinson (San José Cal. EUA). Todos los marcadores se analizarán por citometría de flujo utilizando el programa “Cell Quest Pro” versión 5.1.1 en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD San José Cal. EUA).

