



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"EL FACTOR ESTIMULANTE DE CRECIMIENTO
DE GRANULOCITOS Y MONOCITOS COMO
RECURSO TERAPEUTICO EN TRASTORNOS
HEMATOLOGICOS MALIGNOS"

TRABAJO ESCRITO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A:
FRANCISCO JAVIER AVALOS PALACIOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1991.



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 está 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.

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

Presidente Prof. : GUADALUPE LETICIA CARRASCO RIVERA
Vocal " : RODOLFO PASTELIN PALACIOS
Secretario " : RAUL NIETO CAMACHO
1er. Suplente " : GUILLERMO GONZALEZ VARGAS
2do. Suplente " : SATURNINO DE LEON CHAPA

Sitio donde se desarrolló el tema: BIBLIOTECA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL. BIBLIOTECA DE BIOMEDICAS DE LA U.N.A.M. BIBLIOTECA CENTRAL DEL CENTRO MEDICO NACIONAL.

Nombre y firma del asesor del tema: RAUL NIETO CAMACHO

Nombre y firma del sustentente: FRANCISCO JAVIER AVALOS PALACIOS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

INDICE

	PAG.
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	3
BIOLOGIA DE LAS LEUCEMIAS	5
FACTORES INVOLUCRADOS EN LA ETIOLOGIA DE LAS LEUCEMIAS	8
MANIFESTACIONES CLINICAS Y HEMATOLOGICAS DE LAS LEUCEMIAS	14
ANTECEDENTES DE LA HEMATOPOYESIS	16
RECOMBINACION GENETICA	19
CARIOTIPO Y BANDEO CROMOSOMAL	21
FACTORES ESTIMULANTES DE CRECIMIENTO	23
RECEPTORES DE LOS FACTORES ESTIMULANTES DE CRECIMIENTO	30
EFFECTO DEL FACTOR ESTIMULANTE DE CRECIMIENTO DE GRANULOCITOS/MACRO FAGOS (CFS-GM) EN PACIENTES CON MALIGNIDADES AVANZADAS	33
DISCUSION	44
BIBLIOGRAFIA	47

INTRODUCCION

El término síndrome mieloproliferativo fue propuesto por Dameshek, quien notificó que la producción exuberante en médula ósea de granulocitos, elementos eritroides, megacariocitos, osteoblastos y fibroblastos caracterizaban enfermedades tales como: leucemia mielocítica crónica, mielofibrosis con metaplasia mieloide agnogénica, policitemia vera, trombocitemia esencial maligna, leucemia mielocítica aguda y eritroleucemia.

A esta lista se agregan también los síndromes mielodisplásicos anteriormente conocidos como estados preleucémicos e incluyen: anemia refractaria simple, anemia refractaria sideroblástica, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación y leucemia mielomonocítica crónica.

Por otra parte el proceso de diferenciación y maduración de los elementos mieloides, está regulado por sustancias a las que se les denomina de manera genérica; factores estimulantes de crecimiento.

Se ha observado que en los trastornos mieloproliferativos existe una pérdida del control replicativo, probablemente

relacionado con la calidad ó con la cantidad de los citados reguladores.

Recientemente se han propuesto el uso clínico de estos factores en enfermedades hematológicas malignas como alternativas de tratamientos menos drásticos y más naturales, que los tratamientos clásicos utilizados para estos padecimientos como son la radioterapia y el tratamiento con sustancias alquilantes que ocasionan efectos secundarios muy severos en los pacientes con estas enfermedades.

GENERALIDADES

El término leucemia se establece a principios de siglo: "Es un trastorno hematológico, caracterizado por la exagerada producción, maduración y liberación de leucocitos morfológica y fisiológicamente alterados desde la médula ósea y componentes linforreticulares a sangre periférica y otros tejidos".

Esta definición sin embargo, solo comprende a las leucemias crónicas en que la tendencia a madurar de la clona afectada se manifiesta por la hiperleucocitosis, así como la presencia de leucocitos en diferentes estadios de maduración. En la leucemia mieloide aguda, la producción es exagerada pero invariablemente la maduración está retenida, (células amitóticas o células en fase G₀) y la liberación puede o no estar alterada de aquí que es posible encontrar en la leucemia aguda cuenta de leucocitos totales normales, altas ó bajas pero siempre con predominio de células inmaduras.

A nivel de médula ósea existe una franca infiltración que generalmente en las leucemias linfoblásticas es hasta de un 100% y en las mieloblasticas este porcentaje es menor, pero en ambos casos se denota la presencia de elementos inmaduros.

La aparición de las manifestaciones clínicas varia segun el tipo de leucemia, asi en las agudas el comienzo es súbito y difiere notablemente del insidioso de la variedad crónica.

BIOLOGIA DE LAS LEUCEMIAS

Las leucemias pueden ser explicadas como la proliferación de una clona de células hematopoyéticas anormales que tienen las siguientes características: a) una pobre respuesta para los mecanismos reguladores normales, b) baja tendencia en la capacidad para diferenciaciones a células normales y c) una posible habilidad para suprimir ó impedir el crecimiento de células mieloides normales.

Los estudios actuales de ciclo celular de células leucemias han permitido mediciones que indican que los mieloblastos normales tienen un tiempo de generación de 24 a 48 horas, mientras que en los mieloblastos leucémicos es de 15 a 60 horas.

La principal diferencia en su fase de generación parece radicar en el hecho que las células mieloides normales siguen una secuencia de desarrollo fijo incorporando ésta capacidad para la generación celular hasta el estadio de mielocito, después la célula se diferencia, circula y muere.

Esto no ocurre en las leucemias agudas ya que las células abandonan la médula ósea y órganos infiltrados en varios grados y permanecen casi indefinidamente capaces de división celular, pero sin llegar a presentarla. El resultado

es una masa expandida de células que no mueren en un orden secuencial y que tienen la capacidad para eventuales crecimientos adicionales.

En términos de ciclo celular, esas células están en una fase G₀, los blastos leucémicos pueden circular como consecuencia de liberaciones ocasionales desde la médula ósea, ellos pueden colocarse en órganos, dividirse y posteriormente reentrar a la circulación.

ALTERACIONES MOLECULARES

Las alteraciones moleculares que afectan al ADN y que pueden inducir la aparición de clonas malignas son:

DELESIONES: En este tipo de mutaciones, parte de un cromosoma se halla ausente y su presentación puede ser homocigota o heterocigota.

DUPLICACION: En las que un segmento del cromosoma está representado dos ó más veces.

TRANSLOCACION: Es un intercambio entre segmentos de cromosomas no homólogos. Un ejemplo clásico de este tipo de alteración es la traslocación 9:22 que se presenta en el 90% de las leucemia mielocítica crónica (LMC) y que se conoce

es una masa expandida de células que no mueren en un orden secuencial y que tienen la capacidad para eventuales crecimientos adicionales.

En términos de ciclo celular, esas células están en una fase G₀, los blastos leucémicos pueden circular como consecuencia de liberaciones ocasionales desde la médula ósea, ellos pueden colocarse en órganos, dividirse y posteriormente reentrar a la circulación.

ALTERACIONES MOLECULARES

Las alteraciones moleculares que afectan al ADN y que pueden inducir la aparición de clonas malignas son:

DELESIONES: En este tipo de mutaciones, parte de un cromosoma se halla ausente y su presentación puede ser homocigota o heterocigota.

DUPLICACION: En las que un segmento del cromosoma está representado dos ó más veces.

TRANSLOCACION: Es un intercambio entre segmentos de cromosomas no homólogos. Un ejemplo clásico de este tipo de alteración es la traslocación 9:22 que se presenta en el 90% de las leucemia mielocítica crónica (LMC) y que se conoce

como cromosoma Philadelphia (Ph).

INVERSION: Ocasionada por la fractura de un segmento de cromosoma seguido de la fusión en posición invertida.

FACTORES INVOLUCRADOS EN LA ETIOLOGIA DE LAS LEUCEMIAS

Al igual que en otros tipos de neoplasias, los factores involucrados en la etiología de las leucemias pueden ser debidos a varios agentes entre los que se encuentran: agentes físicos, químicos, ó infecciosos, descuidos de vigilancia inmunológica y predisposición genética.

AGENTES FISICOS: El efecto biológico de la radiación ha sido ampliamente documentado, desde su descubrimiento en 1887 por Röntgen y a partir de entonces los casos de afectación cada vez son en mayor número sobre todo después del estudio de los sobrevivientes de Hiroshima así como en accidentes en plantas termonucleares o bien en pruebas atómicas.

Se sabe que la radiación ionizante es de tipo corpuscular (alfa y beta) y no corpuscular (gamma). Su capacidad de afectación a las macromoleculas vitales como el ADN depende del poder de penetración de manera que la radiación corpuscular penetra poco ya que son desviadas por campos eléctricos, no así la radiación electromagnética que actúa a distancia. Su efecto es cuantificado en RAD's (un RAD=produce 10^{12} ionizaciones/gramos de tejido) y dependiendo de la dosis, se presenta una supresión total de los elementos medulares

o a dosis bajas, activación de clonas potencialmente malignas (portador de prooncogenes). Las lesiones celulares por radiación, son un mecanismo ya conocido por los sistemas biológicos ya que la evolución se vió favorecida por la presencia de estos agentes físicos, tan es así que la célula cuenta con sistemas de reparación en casos de lesión molecular como son la formación de dímeros de timina e hidroxí ó peroxidaciones en el doble enlace de las pirimidinas.

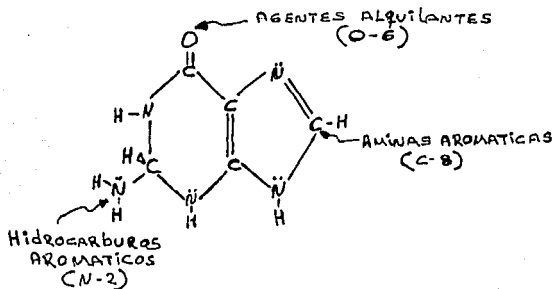
Dentro de los síndromes mieloproliferativos bien documentados con respecto a causa-efecto (radiación-leucemia) está la leucemia granulocítica crónica, pero esto no puede ser tajante ya que en países como el nuestro donde la incidencia de este tipo de leucemias es elevado, no hay en la mayoría de los casos esta relación.

AGENTES QUIMICOS: Los agentes químicos involucrados en la etiología de las leucemias, son sustancias que reaccionan con los grupos ó enlaces de las bases nitrogenadas que conforman el ADN, principalmente con la molécula de guanina.

Estas sustancias ocasionan distorsiones en la molécula de ADN por lo que se pueden producir mutaciones.

Los agentes alquilantes como pueden ser las mostazas nitrogenadas o metilnitrosourea, reaccionan con el oxígeno

6 de la guanina ocasionando metilaciones ó etilaciones en la molécula. Otro grupo de agentes químicos son los derivados de los hidrocarburos aromáticos tales como el benceno, benzopireno y bencentraceno que reaccionan con el nitrógeno de la posición 2 de la guanina con formación de un enlace. Por último están las aminas aromáticas como son las anilinas las que reaccionan con el carbono 8 de la guanina ocasionando formación de enlaces.



GUANINA

Sitios donde actúan las diferentes sustancias químicas produciendo alteraciones moleculares en la molécula de guanina.

AGENTES INFECCIOSOS: Dentro de este grupo de agentes ocasionales de leucemias estan los virus. Esto ha sido bien documentado con el virus Epstein-Barr, ya que al introducirse la partícula viral a los linfocitos, por medio de un sistema de transcriptasa inversa el genoma infectante se adueña de la maquinaria biosintética y se produce la enfermedad (mononucleosis infecciosa), para que esto ocurra es necesario que el virus infectante se ponga en contacto con un linfocito permisible. Pero en algunas personas al parecer tienen resistencia o linfocitos no permisibles, de este modo el genoma viral queda integrado al material genético de la célula y es denominado protooncogen, siendo los linfocitos células de vida larga incluso de años, la probabilidad de que se presenten sustancias o factores promotores incrementa el riesgo de que ese protooncogen se exprese y en este momento se dice que la célula se transforma en una clona maligna que responde de una manera alterada a los estímulos normales de crecimiento.

La expresión de un oncogen se traduce en síntesis de proteínas alteradas ó modificadas con capacidad para activar otros oncogenes ó modifica receptores para factores de crecimiento. Dentro de estas entidades es la leucemia granulocítica crónica donde más se ha avanzado en este campo, se sabe que la síntesis del oncogen es una proteína con actividad de creatin-cinasa y es conocida como proteína 210, cuya función al parecer es la de expresar receptores para

factores estimulantes de crecimiento.

MECANISMOS DE VIGILANCIA INMUNOLOGICA: Los aspectos que involucran un buen funcionamiento inmunológico son 1) El sistema inmune normal debe de poseer la capacidad de reconocer y destruir las células malignas, y 2) Los individuos inmunodeficientes o con descuidos inmunológicos es más factible la instauración de procesos malignos.

Por otra parte las células malignas desarrollan mecanismos mediante los cuales se altera esta vigilancia inmunológica a los que también se les conoce como mecanismos de escape inmunológico y pueden ser diversos como: a) Neoplasias poco antigénicas, b) Modificación de antígenos de superficie, c) Posible proceso de adaptación Darwiniana, c) Parálisis inmunológica por exceso de antígenos y g) Producción de antígenos de alto peso molecular que activan a los linfocitos T supresores.

PREDISPOSICION GENETICA: Se entiende por predisposición genética la incidencia incrementada de presentar algún tipo de malignidad se sabe también que en grupos familiares en donde existe algún tipo de cáncer la probabilidad de que otro miembro de esa familia lo presente es mayor. Esta observación empírica pudo ser comprobada con el estudio de los protooncogenes, que es material genético reprimido pero que

puede ser potencialmente activado por las sustancias promotoras.

En resumen los mecanismos específicos para el desarrollo de un trastorno maligno son aun desconocidos, sin embargo su aparición se debe a situaciones multifactoriales que requieren conjuntarse, tal vez pasen años antes de que el trastorno llegue a expresarse, pero ahí se esta gestando.

MANIFESTACIONES CLINICAS Y HEMATOLOGICAS DE LAS LEUCEMIAS

Como ya se mencionó, en la leucemia aguda el comienzo de la enfermedad es súbito, se parece a una afección aguda o incluso séptica. Otras alteraciones son fiebre, anemia de evolución rápida y signos de insuficiencia granulocítica con ulceraciones de las membranas mucosas sobre todo de la boca y garganta, se presenta púrpura. El aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, bazo e hígado no es muy acentuado. Son frecuentes los dolores en articulaciones y huesos, a veces se presenta postración y malestar general. La evolución es rápidamente progresiva.

Hallazgos hematológicos: Hay anemia presente casi sin excepción y de manera segura, en los casos con manifestaciones clínicas completamente desarrolladas. El tipo de anemia depende de la variante leucemia, en las linfoblásticas la anemia generalmente es normocítica normocromica y en las mieloblásticas es de tipo megaloblástico. Por regla general existe una trombocitopenia de grado moderado a intenso. El recuento leucocitario es a veces muy elevado, pero en general solo está ligeramente elevado, con mayor frecuencia es normal o incluso está disminuido. Una combinación de anemia, trombocitopenia y leucopenia es un hallazgo corriente en la leucemia aguda. Los valores absolutos de polimorfonucleares también estan depletados. La severidad de la anemia, trombo-

MANIFESTACIONES CLINICAS Y HEMATOLOGICAS DE LAS LEUCEMIAS

Como ya se mencionó, en la leucemia aguda el comienzo de la enfermedad es súbito, se parece a una afección aguda o incluso séptica. Otras alteraciones son fiebre, anemia de evolución rápida y signos de insuficiencia granulocítica con ulceraciones de las membranas mucosas sobre todo de la boca y garganta, se presenta púrpura. El aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, bazo e hígado no es muy acentuado. Son frecuentes los dolores en articulaciones y huesos, a veces se presenta postración y malestar general. La evolución es rápidamente progresiva.

Hallazgos hematológicos: Hay anemia presente casi sin excepción y de manera segura, en los casos con manifestaciones clínicas completamente desarrolladas. El tipo de anemia depende de la variante leucemia, en las linfoblásticas la anemia generalmente es normocítica normocromica y en las mieloblásticas es de tipo megaloblástico. Por regla general existe una trombocitopenia de grado moderado a intenso. El recuento leucocitario es a veces muy elevado, pero en general solo está ligeramente elevado, con mayor frecuencia es normal o incluso está disminuido. Una combinación de anemia, trombocitopenia y leucopenia es un hallazgo corriente en la leucemia aguda. Los valores absolutos de polimorfonucleares también estan depletados. La severidad de la anemia, trombo-

citopenia y neutropenia dependen del grado de infiltración y tiempo de evolución de la enfermedad.

Con respecto a la leucemia granulocítica crónica, el paciente puede presentar síndrome anémico o experimentar un ataque al estado general, siempre en orden creciente de malestar. El bazo aumenta progresivamente de tamaño y el paciente empieza a perder peso y presentar fiebre así como diaforesis de predominio nocturno, estos dos datos asociados a un aumento del metabolismo celular de los granulocitos. Los infartos esplénicos causan dolores en el cuadrante superior izquierdo del abdomen. No suelen observarse linfadenopatías.

Hallazgos hematológicos: Los leucocitos están muy elevados, la fórmula leucocitaria es característica. Hay un espectro completo de células granulocíticas, desde unos pocos mieloblastos hasta neutrófilos maduros.

Las cifras de plaquetas, basófilos así como de eritroblastos son indicativos del grado de afectación celular, e incluso estos parámetros son empleados con fines pronósticos.

ANTECEDENTES DE LA HEMATOPOYESIS

La producción de los elementos formes de la sangre, se inicia a partir de una célula pluripotencial denominada hemocitoblasto el cual a su vez se deriva del hemohistioblasto.

El hemocitoblasto ahora conocido como célula madre hematopoyética mieloide/linfoide, es una célula indiferenciada sensible a estímulos bioquímicos que orientan su diferenciación hacia la producción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Dichos estímulos son generalmente de tipo hormonal, como la eritropoyetina, cuya acción muy conocida es estimular la producción y maduración de los eritrocitos.

Con respecto a los leucocitos, existen diversidad de criterios pues algunos investigadores han demostrado la presencia de cierto tipo de hormonas androgénicas que influyen la leucopoyesis, algunos otros han estimulado la producción de granulocitos mediante la administración de un activador plasmático que le denominan leucopoyetina, sin embargo otro grupo de investigadores piensa que la producción y maduración de los leucocitos está dado por su depleción en sangre periférica.

En el esquema de maduración de las células sanguíneas,

la sustancia que se considera actúa sobre las células más tempranas no comprometidas como es la célula madre hematopoyética mieloide/linfoide es la interleucina 3 (IL-3).

Por la acción de esta sustancia, la célula pasa a otro estadio de maduración con la formación de un tipo celular más diferenciado conocido como célula madre mieloide (CMM) y célula madre linfoide. (CML).

La CMM expresa receptores que reconocen al factor estimulante de crecimiento de granulocitos-macrófagos (FSC-GM), que influyen para que la célula se derive a células comprometidas en algún tipo de diferenciación específicos conocidos como unidades formadoras de brotes de eritrocitos (BFU-E), unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (CFU-GM), unidades formadoras de colonias de eritrocitos (CFU-E) y unidades formadoras de colonias de megacariocitos CFU-M_g).

Las unidades formadoras de colonias por la acción constante del factor estimulante de crecimiento de granulocitos-macrófagos (FSC-GM) y por la influencia de otros factores estimulantes de crecimiento como son, el factor estimulante de crecimiento de granulocitos (FSC-G), el factor estimulante de crecimiento de monocitos (FSC-M), la eritropoyetina y la trombopoyetina siguen su curso de diferenciación y maduración

hasta células reconocidas morfológicamente como son los mieloblastos, monoblastos, proeritroblastos y megacarioblastos.

Estas células inmaduras ya comprometidas por un constante curso de maduración se transforman en granulocitos, macrófagos, eritrocitos y plaquetas, células aptas para su función fisiológica en la hemostasia del organismo.

RECOMBINACION GENETICA

Los primeros estudios realizados en células eucariotas llevaron a la conclusión de que el apareamiento de cromosomas homólogos (sinapsis) debía de ser un fenómeno extraordinariamente preciso.

Los estudios genéticos ultraestructurales permitieron localizar el punto en que se producía la recombinación y situarlo entre dos nucleótidos adyacentes.

Actualmente la recombinación genética puede ser detectada gracias al análisis de la distribución de marcadores en la progenie de un cruce entre genomas progenitores distintos.

Entrecruzamiento: Este proceso se estudia a través de la recombinación de marcadores cromosómicos que se encuentran a una cierta distancia entre sí, como son los que forman parte de genes no adyacentes, el entrecruzamiento se produce por ruptura y reparación de las moléculas de ADN.

Los mecanismos moleculares del modelo de entrecruzamiento se dedujo por estudios realizados con bacteriófagos. La acción combinada de endonucleasas y de exonucleasas pone al descubierto la secuencia de bases de una de las cadenas.

Dado que este proceso tiene lugar en diversos segmentos de ADN de la misma célula y de forma simultánea, ciertas áreas de la cadena única de una molécula podrían aparearse con un segmento complementario situado en una molécula distinta. Las moléculas resultantes están unidas entre sí y parte de ellas se encuentran sin aparear, estos fragmentos no apareados son degradados, también contienen zonas formadas por una única cadena de ADN, las cuales son rápidamente reconstruidas por acción de una ADN-polimerasa.

EL CARIOTIPO Y BANDEO CROMOSOMAL

La citogenética humana se define como el estudio microscópico de los cromosomas humanos (o sus equivalentes en el núcleo en reposo) y la correlación entre sus anomalías y las del paciente.

Las técnicas habituales de laboratorio comprenden la pruebas de cromatina sexual y los análisis cromosómicos (cariotipos). En 1956 Tjio y Levan aplicaron técnicas modificadas al cultivo de tejidos para estudiar las células humanas. Añadiendo colchicina a sus preparaciones durante las últimas horas del cultivo obtenían gran número de metafases para su estudio, el tratamiento con soluciones hipotónicas de las células esparcía los cromosomas dentro de la célula y los hacía distinguibles individualmente.

Los cromosomas cuya heterocromatina ha sido desnaturada por acción de un álcali y cuyo ADN ha sido "anillado" en una solución de cloruro sódico y citrato, presentan patrones de tinción con el colorante de Giemsa y forman bandas que permiten identificar los cromosomas.

El estudio del cariotipo en las enfermedades mielodisplásicas se utiliza para relacionar las alteraciones que se producen ya sea por cambios cromosomales o por pérdidas

de partes de los cromosomas y sus efectos fisiopatológicos. Estos cambios cromosómicos pueden producir proteínas anormales o simplemente dejar de producirse proteínas que se requieren para un adecuado funcionamiento celular.

En las enfermedades mieloproliferativas como es el caso de las leucemias, el único tipo donde se presenta una franca aberración es la leucemia granulocítica crónica (cromosoma Filadelfia ph^1), otros como leucemia linfocítica crónica son escasos los reportes y en la leucemia mieloblástica se citan varias alteraciones en el cariotipo no contundentes a excepción del síndrome 5q- (cromosoma deletado).

FACTORES ESTIMULANTES DE CRECIMIENTO

Las investigaciones tecnológicas con ADN recombinante han permitido definir las características de los factores estimulantes de crecimiento como un grupo de hormonas de naturaleza glicoproteica que son las que regulan la producción y diferenciación de las células sanguíneas.

Los factores estimulantes de crecimiento (CFSs), fueron descritos por Bradley y Metcalf así como por Ickikawa y colaboradores en estudios de clonas de células hematopoyéticas.

Cuando las clonas de células progenitoras estuvieron en un medio de agar semisólido, requerían constantemente de la estimulación por reguladores moleculares específicos para crecer y formar colonias.

El estudio de los CFSs era limitado inicialmente por su baja concentración en los tejidos humanos.

Con la utilización del método de ADN recombinante, los CFSs están ahora disponibles en cantidades suficientes para pruebas clínicas y para promover investigaciones básicas. Al menos un tipo de CFSs parece ser sintetizado por todos los tejidos humanos (CFS-GM), pero solamente en cantidades

mínimas. Sin embargo de lo que se sabe sobre los mecanismos básicos de los CFSs mucho está basado en estudios hechos en ratón.

Cuatro CFSs están bien reconocidos: Factor estimulante multipotencial (MULTI-CFS), también conocido como Interleucina 3 (IL-3), Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (CFS-GM), Factor estimulante de colonias de granulocitos (CFS-G), y Factor estimulante de colonias de macrófagos (CFS-M).

Por sus efectos estimulantes en células hematopóyéticas los CFSs influyen en comprometer a las células para un curso particular de diferenciación, la actividad funcional de células maduras y supervivencia celular.

Los cuatro CFSs traslapan algunas de sus actividades biológicas pero en su secuencia de aminoácidos no son homólogos. Cada CFS parece unirse con receptores específicos que no reconocen otros CFSs directamente. Esos receptores de alta afinidad están en células que responden a CFSs y cada célula puede tener más que un solo tipo de receptores de alta afinidad para CFSs. Esto indica una considerable interacción entre ellos.

Es probable que esos factores sean codificados por

un simple gen primordial de factores de crecimiento y entonces diverjan en su evolución hacia una familia de hormonas glicoproteicas que regulan colectivamente la producción de células sanguíneas.

La interleucina 3 (IL-3), es un CFS multipotencial que se considera de acción temprana en la cascada hematopoyética. Su objetivo es el progenitor mielóide, el cual es capaz de diferenciación en granulocitos, monocitos, megacariocitos y células eritroides. "In vitro" la IL-3 estimula unidades formadoras de colonias eritroides (BFUs-E), así también como la formación de colonias de granulocitos/macrófagos.

Durante la diferenciación terminal, precursores de granulocitos/macrófagos que se formaron respondiendo solamente a IL-3, adquieren la habilidad para responder y requieren la presencia de factores adicionales de crecimiento, incluyendo CFS-GM y CFS-M.

Estudios en monos sugieren que IL-3 no solamente pone en movimiento la cascada hematopoyética, sino que ayuda al crecimiento de muchas de las células que están posteriormente comprometidas.

La importancia de CFS-GM también consiste en su efecto de amplio rango en ambos progenitores mieloides (granulocitos/

macrófagos) y en su efecto de maduración en células mieloides.

El CFS-GM recombinante humano estimula no solamente la formación de granulocitos y macrófagos en médula ósea enriquecida con células progenitoras, sino también colonias multipotenciales que contienen elementos eritroides, monocitos y megacariocitos.

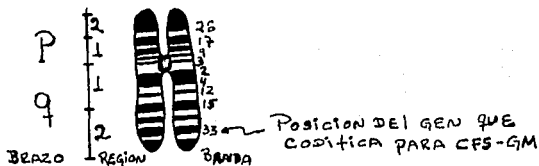
De hecho bajo regulación con receptores específicos de CFSs fueron observadas respuestas a estímulos de granulocitos/macrófagos con los o más tipos de CFSs. Efectos sinérgicos en colonias formadoras de macrófagos son observadas entre CFS-GM y CFS-M y en muchas actividades de los CFSs evidencian una organización jerárquica.

Mediante el uso de células somáticas híbridas (hibridaciones cromosomales), se ha descubierto que los genes que codifican para tres factores estimulantes de crecimiento hematopoyéticos están localizados en el brazo largo distal del cromosoma 5 (en banda 5q 23-31 para IL-3 y para CFS-GM, y en banda 5q 33.3-33.2 para CFS-M) en yuxtaposición para el protooncogen *c-fms*, (en banda 5q 33.3-33.2). El protooncogen *c-fms* codifica para una proteína no transformable y puede ser idéntica para el receptor de CFS-M.

No es sorprendente que esta región cromosomal es

suprimida frecuentemente en las neoplasias mieloides.

Por otro lado, los genes que codifican para CFS-G están mapeados en el cromosoma 17.



CROMOSOMA 5

La localización del gen humano para la región cromosomal 5q 23-31 es importante desde varias perspectivas: Las deleciones adquiridas que involucran el brazo largo del cromosoma 5, fue originalmente reportado como una anomalía cromosómica en tres pacientes con anemia refractaria. Este desorden se conoce como el síndrome 5q-, esta entidad generalmente se a observado en mujeres adultas con diagnóstico de anemia refractaria, con cuenta normal o levemente baja de leucocitos y elevada cuenta de plaquetas.

La misma anomalía cromosómica es a menudo detectada

en pacientes con leucemia mielocítica aguda (LMA) usualmente asociados con otras anormalidades cromosómicas

La deleción parcial 5q descrita para LMA es una frecuente anormalidad en pacientes con LMA quienes tienen una historia de exposiciones a sustancias químicas tóxicas

Aunque la anormalidad cromosómica 5q parece afectar la línea del sistema celular común de los granulocitos-eritrocitos y megacariocitos no hay fundamentos que permitan explicar la deleción de la región específica del cromosoma con el respectivo desorden hematológico

Los factores estimulantes de crecimiento también han sido estudiados para su potencial uso en varios tratamientos hematológicos infecciones y desórdenes neoplásicos.

Los resultados preliminares usando factores de crecimiento de granulocitos macrófagos restablecen la competencia leucocitaria. En pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, (SIDA) y síndrome mielodisplásicos estos resultados han sido impresionantes. Por otra parte los efectos tóxicos generalmente no son severos.

Otras manifestaciones ocasionadas por CFS GM incluyen el aumento de la función asesina de granulocitos maduros y

macrófagos ya que este factor estimula las funciones leucocitarias de quimiotaxis, fagocitosis, citotoxicidad mediada por células y producción de ión superóxido.

RECEPTORES DE LOS FACTORES ESTIMULANTES DE CRECIMIENTO

Los factores estimulantes de crecimiento de granulocitos/macrófagos (CFS-GM) e interleucina 3 (IL 3), son factores de crecimiento hematopoyéticos con habilidades estimulantes variadas que ejercen su efecto en las células a través de receptores específicos de membrana.

Los receptores de CFS-GM y IL-3 están frecuentemente coexpresados en las células de leucemia mielocítica aguda y la respuesta mitógena entre las diferentes clases de leucemia mielocítica aguda a CFS-GM y IL-3 a menudo coinciden. Efectos paralelos de CFS-GM y IL-3 en la formación de colonias de progenitores de células normales purificadas de médula ósea también han sido demostrados. Esos estudios sugieren que el control del crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas por CFS GM y IL-3 está íntimamente correlacionado.

Recientemente han sido obtenidas evidencias de la existencia de las estructuras de los receptores en los blastos de LMA y líneas celulares leucémicas de ratón y en los dos casos se ha presentado alta afinidad para ambos, CFS-GM y IL-3.

Se ha comparado la capacidad de células de LMA, monocitos y granulocitos para unir CFS-GM y IL-3. Se confirmó

que los blastos de LMA así como monocitos, expresaron estructuras de membrana y que ambos pueden unir CFS-GM y IL-3 con una elevada afinidad.

En suma hay un sitio de unión común para CFS-GM y IL-3 además de tres sitios de unión selectivos para CFS-GM e IL-3 que han sido distinguidos: Un receptor de baja afinidad para CFS-GM pero sin receptores para IL-3 (células de LMA y monocitos), un receptor de alta afinidad para IL-3 pero que no une a CFS-GM (monocitos y algunos casos de LMA) y un receptor con afinidad intermedia para CFS-GM y que no une IL-3 (neutrófilos).

Esto es importante porque en algunas leucemias mieloblásticas se pierde esa afinidad para los citados factores estimulantes y por tanto la clona maligna hace que tenga un comportamiento anárquico.

Se ha demostrado que el CFS-GM tiene una cadena polipeptídica de 127 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 22 kD, aunque el valor puede variar considerablemente dependiendo del grado de glicosilación.

La pronta disposición de CFS-GM humano, producido por tecnología de ADN recombinante ha facilitado el estudio clínico de esas glicoproteínas en varios desordenes hematológi-

cos incluyendo: leucemias, hematopoyesis inefectiva encontrada en síndromes mielodisplásicos y la leucopenia secundaria al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

EFEECTO DEL FACTOR ESTIMULANTE DE CRECIMIENTO DE GRANULOCITOS/
MACROFAGOS (CFS-GM) EN PACIENTES CON MALIGNIDADES AVANZADAS

Los autores, Ulrich Dührsen, George Morstyn y Donald Metcalf, efectuaron un estudio que incluye a 37 pacientes con diferentes tipos de malignidades hematológicas tales como: leucemia granulocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, mieloma múltiple y linfoma maligno, los cuales presentaban las siguientes características hematológicas: anemia moderada, leucopenia y trombocitopenia.

El tratamiento se efectuó bajo una fase de administración de 0.3 a 30 microgramos/Kg/día de factor estimulante de crecimiento de granulocitos/macrófagos recombinante humano.

Estos estudios, donde se valora la efectividad del tratamiento a base de CFS-GM, los siguientes resultados sobresalientes, los cuales permitieron confirmar y extender las recientes observaciones en las que, la administración de CFS-GM a pacientes, incrementa el número de células progenitoras hematopoyéticas circulantes. Aunque la aplicación de CFS-GM produjo una disminución inicial en células progenitoras circulantes, esta fue seguida por un crecimiento, que fue interrumpido ocasionalmente por una depleción pasajera por el séptimo día de tratamiento. El nivel de células progenitoras como de células maduras en sangre periférica permaneció elevado

cinco días después de la primera inyección.

La caída inicial de células progenitoras circulantes fue rápido e involucró todo tipo de progenitores, en donde el mecanismo más probable es el de un proceso de secuestro, similar al reportado por los granulocitos maduros durante las primeras horas del tratamiento.

La elevación subsecuente de células progenitoras en sangre periférica observadas en el día 5, es probable que sea la consecuencia de un incremento en la producción de células progenitoras, por la elevación en las células maduras vistas por los días 9 y 10 de la terapia. La segunda caída en las células progenitoras observada en el día 7 puede ser resultado de mecanismo inhibitorios de retroalimentación que han sido postulados para explicar todas aquellas oscilaciones cíclicas. Números absolutos de células progenitoras en médula osea no pueden ser calculados, sin embargo la frecuencia sin cambio de esas células durante la administración de CFS-GM y el reporte de incremento de celularidad de la médula sugiere que el número absoluto de las células progenitoras en la médula pudo también haber crecido.

El hecho de que el aumento posterior a la administración de CFS-GM preferentemente estimula a los progenitores de granulocitos/macrófagos no así a los precursores de

eritrocitos y megacariocitos, sugiere que CFS-GM puede contribuir selectivamente a la amplificación de células progenitoras particulares. Una observación similar ha sido hecha con eritropoyetina que amplifica preferentemente "in vivo" el "pool" de CFU-E. A pesar del incremento en el número de células precursoras, el nivel de eritrocitos y plaquetas no cambia significativamente después de la administración de CFS-GM, lo que sugiere la importancia de otras líneas específicas reguladoras para los estadios terminales de maduración de esas líneas celulares.

El incremento de células progenitoras después de la administración de CFS-GM puede tener importancia en permitir la recolección de células periféricas para repoblación de la médula ósea de pacientes hematológicos.

Esta especulación en el uso de esas hormonas para la obtención de células en sangre periférica para el trasplante de médula ósea asume el propósito que las células hematopoyéticas primitivas crecen en paralelo con células progenitoras medibles después del tratamiento con CFS-GM.

Por otra parte en estudios efectuados en pacientes con leucemia mielocítica aguda se analizan las cualidades de los factores estimulantes de crecimiento; CFS-GM, IL-3, CFS-G, CFS-N y EPO para inducir la maduración de células de

LMA.

Una cuestión fundamental en el estudio de la LMA es si esas células son capaces, cuando son apropiadamente estimuladas para madurar más allá del estado blástico a las formas terminales diferenciadas y de ese modo la maduración bloqueada que caracteriza a la leucemia puede ser superado.

Se dirigió esta cuestión en experimentos en los cuales células de LMA de un grupo de 25 pacientes fueron cultivadas bajo diferentes condiciones de factores estimulantes de crecimiento y se mostró la habilidad de las células para madurar a monocitos/macrófagos y a granulocitos en respuesta a factores estimulantes de crecimiento como: CFS-GM, IL-3, CFS-G, CFS-M y EPO.

Primeramente se demostró que la ausencia de estímulos externos ocasionó que las células de 14 de 25 casos sufrieron maduración progresiva en el cultivo. El mecanismo intrínseco que produjo esta espontánea maduración más probablemente involucró la producción autocrina de factores que pueden estimular la maduración de células blásticas. Tal estímulo endógeno podría originarse de cualquiera de las células de LMA como ha sido propuesto por varios investigadores, pero que de alguna manera es inhibido en el microambiente de la médula ósea.

Las células candidatas para la producción de factores de crecimiento endógeno son las monocíticas que se encuentran a menudo entre la masa de células de LMA.

Se sabe que los monocitos muestran actividad para liberar una variedad de factores ejem: CFS-GM, CFS-G, CFS-M, factor de necrosis tumoral e IL-3. Los dos últimos pueden en su oportunidad modular la producción de CFSs en una variedad de tipos celulares.

Apoyando también el papel que desempeña el factor endógeno podía estar en concordancia con la observación que la maduración espontánea era notada más frecuentemente en los casos de LMA con un alto número de células monocíticas en materiales precultivados.

Otros casos de LMA exhibieron "espontánea" síntesis de ADN en cultivos no estimulados. Así mismo después de adherencia a material plástico o por depleción de elementos monocíticos maduros, la maduración espontánea y proliferación denotaron disminución. Esto parece indicar que el estímulo endógeno está principalmente originado desde blastos de la LMA.

En un limitado número de pacientes la IL-3, CFS-GM y CFS-G podían acrecentar la formación de granulocitos maduros

o macrófagos "in vitro", mientras que CFS-M solamente estimula el desarrollo de macrófagos. En varios casos uno o más de esos CFSs fueron extremadamente activos para activar células de LMA in vitro, sin embargo los mismos CFSs fallaron para inducir un significativo grado de maduración en muchos de esos casos.

De este modo, aunque las células de LMA son aparentemente susceptibles a esos factores, las células fallaron para madurar. Solamente por adición combinada de CFSs en el cultivo, una fracción de esos casos alcanzó una maduración algo extensa.

Estos encuentros podían indicar que las células de LMA sí responden esencialmente a los factores de crecimiento pero la traducción de esa señal y la cascada intracelular aunque resulta en una apropiada maduración de células mieloides, esta es anormal.

La variabilidad en el grado de maduración y la respuesta a diferentes factores de crecimiento entre el grupo de pacientes con LMA es característica notable de la heterogeneidad biológica de la enfermedad. Aparentemente es una expresión de la aunque mínima habilidad de la célula maligna para responder a esos estímulos y realizar la subsecuente maduración. Visto de este modo, los casos en los que no se

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

observó maduración en la presencia de CFSs son realmente clonas defectuosas en cuanto a maduración con un absoluto bloqueo de diferenciación.

A lo largo de las líneas de maduración de monocitos contra granulocitos, cuando son expresadas "in vitro", no podían usualmente ser predichos por el tipo de CFS agregado al cultivo. Por ejemplo IL-3, CFS-GM y CFS-G inducían la diferenciación terminal de elementos de granulocitos y monocitos en frecuencia aproximadamente equivalentes. Los resultados con CFS-M por otro lado mostraron una tendencia preferencial a inducir la maduración de monocitos.

Esto podría indicar que algunas leucemias "in vivo" expresan principalmente las características citológicas de una cierta línea, pero bajo ciertas condiciones "in vitro" la diferenciación va hacia otra dirección.

El empleo de factores estimulantes de crecimiento de granulocitos/macrófagos también ha sido orientado hacia otras patologías como son la anemia aplásica y síndromes mielodisplásicos (SMD).

El estudio consistió en la administración de CFS-GM en dosis que variaron desde 15 a 480 microgramos/M² de superficie corporal a 7 pacientes con anemia aplásica y 7

pacientes con síndromes mielodisplásicos.

Las características hematológicas de los pacientes consistían en; anemia, leucopenia y trombocitopenia por lo que requerían de transfusiones sanguíneas para mejorar los niveles de células sanguíneas.

Los pacientes con anemia aplásica y los pacientes con SMD presentan cierta similitud tanto clínica como hematológica.

Los SMD son considerados como una dishematopoyesis que afecta el crecimiento y diferenciación de los elementos formes de la sangre, en tanto la aplasia medular puede reflejar una variedad de procesos fisiopatológicos tales como: deficiencias de células estaminales, desordenes de la inmunidad humoral y celular o anormalidades del microambiente medular.

En estas dos entidades, pero sobretodo en la anemia aplásica no se cuenta con esquemas terapéuticos efectivos excepto el trasplante de médula ósea.

La valoración de los resultados para estos pacientes tratados con CFS-GM fue la siguiente: En los pacientes con anemia aplásica solo se presentó una leve mejoría en las cuentas sanguíneas y hubo variaciones importantes entre los

pacientes. El tiempo medio para el incremento máximo (pico) fue de 4 días (rango de 1 a 21 días).

De manera similar el pico de monocitos fue en el tiempo medio de 5 días (rango de 1 a 21 días) y la cuenta pico de reticulocitos fue en un tiempo medio de 13 días. (rango de 1 a 21 días).

Así mismo se observó un incremento en la cuenta de granulocitos y monocitos cuando se usaron dosis bajas pero el aumento de reticulocitos estuvo asociada más frecuentemente a dosis altas.

Hubo una variabilidad sustancial entre pacientes en cuanto a su respuesta al CFS-GM aunque a nivel individual los pacientes denotaron una adecuada respuesta en cuanto a diferenciación de las 3 líneas celulares.

En los enfermos con SMD, en comparación con los pacientes con anemia aplástica, generalmente tuvieron una respuesta más impresionante de las tres líneas celulares a la administración de CFS-GM. Sin embargo no fue el caso de una extremada leucocitosis o un mejoramiento de los requerimientos transfusionales de globulos rojos o de plaquetas.

El tiempo pico para la cuenta de granulocitos fue

de 9 días (rango de 1 a 14 días), la cuenta pico para monocitos fue de 6 días (rango de 2 a 14 días) y los reticulocitos tuvieron un tiempo medio para la cuenta pico de 5 días (rango de 1 a 21 días).

Como se observó en pacientes con anemia aplásica fue difícil detectar una relación entre la respuesta y la dosis en pacientes con SMD cuando el grupo fue examinado completo por la heterogeneidad de los pacientes y las diferencias de las dosis catalogadas. Hubo incrementos detectables en la cuenta de granulocitos, monocitos y reticulocitos a niveles de dosis bajas, pero la respuesta más grande ocurrió a dosis altas de 240 y 480 microgramos/m² de superficie corporal.

La toxicidad fue uniformemente leve. Las molestias predominantes fueron; dolor de espalda, molestias en costillas y esternón, anorexia, mialgias y un bajo grado de fiebre.

Es interesante que las molestias en espalda, costillas y esternón fueron observadas primariamente en pacientes con más celularidad medular en SMD, lo que sugiere que el dolor era debido en algún modo por la estimulación de células medulares.

No hubo evidencias de conversiones leucemicas en

ninguno de los pacientes y aunque en dos ocasiones fue observado un incremento en el número de mieloblastos en pacientes con mielodisplasias, en ambos casos fue pasajero. No se observaron anticuerpos anti-CFS-GM en ninguno de los pacientes tratados con múltiples exposiciones a la proteína.

Repetidas exposiciones a CFS-GM parecen ser seguras.

DISCUSION

Los detalles del control y regulación de la hematopoyesis son todavía oscuros. Sin embargo el descubrimiento clonación y producción de factores estimulantes de crecimiento hematopoyéticos puede permitir la diserción de las reglas de estas proteínas en la generación de células sanguíneas. Hay evidencia que el CFS-GM circulante esta involucrado en el control de la hematopoyesis, sin embargo interacciones locales con el estroma pueden ser importantes.

Es probable que una regla primaria de CFS-GM "in vivo" es la estimulación de la médula y la activación de las células maduras en respuesta a las infecciones.

Se habla de la ventaja de conocer los efectos proliferativos de CFS-GM recombinante humano en grupos de pacientes fisiológicamente distintos.

Estos estudios fueron hechos primariamente para observar la toxicidad de los factores de crecimiento cuando son administrados a humanos pero también para determinar en todo caso, si los efectos proliferativos de CFS-GM en la médula ósea, podrian mejorar las citopenias de pacientes con deficiencias en el número de células estaminales o desordenes de maduración en estas células.

Se eligieron dosis breves de infusiones de CFS-GM por tres razones: Puesto que CFS-GM inhibe la migración de los neutrófilos, se interesó que un componente de la leucocitosis observada en animales y humanos reflejó restringido egreso de las células maduras desde la sangre, además de la estimulación medular, dicho confinamiento de granulocitos a la circulación podría ser dañino.

Segundo: Si CFS-GM fue de valor en el tratamiento de la falla de la médula ósea se supuso que podía ser necesario administrarse frecuentemente. Y tercero; Se quiso evitar la leucocitosis extrema y posible hematopoyesis extramedular que se observa con infusiones continuas.

En el caso de tratamiento de pacientes leucemicos con CFS-GM, se deben de tener en cuenta ciertas consideraciones: Esos factores son potentes estimuladores de la proliferación celular y en muchos casos cualquiera podría incluir los riesgos de empujar el crecimiento descontrolado progresivo de la leucemia. Otra consideración es que la maduración de las células leucémicas es solamente rara vez potenciado por esos factores, más a menudo hacia monocitos y así se limita solamente a una extensión celular. También está demostrado que esos factores estimulantes de crecimiento pueden promover la autorrenovación celular en el caso de LMA.

Por lo tanto se cree que la terapia con CFSs debe de ser diferente en los pacientes y no puede tener una aplicación general.

En vivo si se propone la administración de CFSs se debe individualizar en cada paciente, analizar el tipo de células malignas "in vitro", deducir su respuesta de maduración y proliferación y de este modo seleccionar el tipo de CFSs apropiado.

Lo importante de este recurso terapéutico es incrementar el arsenal antineoplásico, el existente es extremadamente tóxico e incluso capaz de generar segunda malignizaciones.

BIBLIOGRAFIA

1. Antin J.H, Smith R? Holmes W. and Rosenthal D.S.: Phase I/II Study of Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndrome: Blood Vol. 72: No. 1: 705-713, 1988.
2. Bohinski C. Robert. Bioquímica. Primera Edición. Fondo Educativo Interamericano 111-146, 1978.
3. Budel L, Elbaz O. Delwel R, Lowenberg B and Touw I.: Common Binding Structure for Granulocyte macrophage colony-stimulating- factor on Human acute myeloid leukemia cells and monocytes; Blood Vol. 75 No. 7-3: 1439-1445, 1990.
4. Cannistra S.A. and Griffin J.D.: Regulation of the Production and Function of Granulocytes and Monocytes; Seminars in Hematology Vol. 25 No. 3: 173-188, 1988.
5. Clark S.C. and Kamen R.: The Human Hematopoietic Colony-Stimulating Factors. Science Vol. 236, 1229-1237, 1987.
6. Davis-Dulbecco. Genética Bacteriana y Molecular. Sexta Edición Ed. Salvat. 175-189, 1978.
7. Gropman J.E.: Colony-Stimulating Factors: Present Status and Future Applications. Seminars in Hematology, Vol. 25 suppl. 3: 30-37 1988.
8. Huebner K, Isobe M, Golde D.W. and Gasson J: The Human Gene Encoding GM-CFS is at 5q 21-q32, The Chromosome Region Deleted in the 5q-Anomaly. Science Vol. 230: 1282-1283, 1987.

9. Metcalf D; The consequences of excess levels of haematopoietic growth factors. British Journal of Hematology, Vol. No. 1 75; 1-3, 1990.
10. Onetto N. Aumont N. Wong G, and Clark S.C.: Characterization of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; Blood Vol. 75: No. 1-2 59-66, 1990.
11. Phillips N., Jacobs S. Stoller R. and Earle M.; Effect of Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor on Myelopoiesis in Patients with Refractory Metastatic Carcinoma. Blood Vol. 74 No. 1: 26-34, 1989.
12. Salem M. Delwel R and Clark S: Maturation of Human acute myeloid leukaemia in vitro: The response to five recombinant haematopoietic factors in a serum-free system. British Journal of Haematology. Vol. 71: No. 3-4 363-370, 1989.
13. Strife H. and Clarkson B.: Biology of Chronic Myelogenous Leukemia: Is Discordant Maturation The primary Defect?. Seminars in Hematology. Vol. 25 No. 3: 1-19 1988.
14. Todd-Sanford. Diagnostico Clínico por el Laboratorio. Sexta Edición, Ed. Salvat. 274-30 , 1978.
15. Villeval J.L, Dührsen U, Morstyn G and Metcalf D: Effect of recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor on progenitor cells in patients with advanced malignancies.