



00346  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

8  
24

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO SOBRE FIBROSIS DE MEDULA OSEA  
ASOCIADA A LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA:  
PARTICIPACION DE INTERLEUCINA 1 ALFA  
SECRETADA POR LAS CELULAS LEUCEMICAS EN  
LA PROLIFERACION DE FIBROBLASTOS  
DE MEDULA OSEA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**(BIOLOGIA CELULAR)**  
P R E S E N T A :  
**JUAN JOSE MONTESINOS MONTESINOS**

DIRECTOR DE TESIS: MED. CIR. MARIO GUTIERREZ ROMERO

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Hematología, Hospital General de México y en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, bajo la dirección del Dr. Mario Gutiérrez Romero y la co-dirección de la Maestra en Ciencias María de Lourdes Mora García.**

**Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del CONACyT mediante el programa de becas nacionales.**

**AL AMOR Y A LA CIENCIA UN ALTAR**

**A MI ESPOSA:**

**Porque ha caminado conmigo motivando cada instante que transcurre y porque es mi razón de continuar.**

**A MI MADRE:**

**Por su amor tan grande y apoyo incondicional.**

**A MIS HERMANOS:**

**Porque con ellos comparto los momentos más especiales.**

**A MIS AMIGOS:**

**Mary, Joel, Miguel y Fabiola, compañeros por siempre.**

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABREVIATURAS</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>MARCO TEORICO</b>	
La médula ósea como órgano hematopoyético .....	6
A. Origen embrionario .....	6
B. Componentes de la médula ósea .....	8
1. Células hematopoyéticas .....	8
2. Estroma .....	10
3. Matriz Extracelular .....	12
4. Sistema vascular .....	13
5. Microambiente hematopoyético .....	14
Producción de células sanguíneas .....	16
A. Componentes sanguíneos y sus precursores .....	16
B. Citocinas hematopoyéticas .....	19
1. M-CSF .....	19
2. GM-CSF .....	21
3. PDGF .....	22
4. IL-1 .....	23
Leucemias y biología de la leucemia aguda linfoblástica .....	26
Fibrosis de la médula ósea .....	30
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	33
<b>HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>METODOLOGIA</b> .....	36
<b>RESULTADOS</b> .....	40
<b>DISCUSIÓN</b> .....	56
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	61
<b>APÉNDICES</b> .....	80

## RESUMEN

En nuestro país la leucemia junto con los linfomas ocupan el primer lugar de incidencia entre las neoplasias que afectan a la infancia y el cuarto lugar en individuos adultos. Una variedad de leucemia muy frecuente en niños y en adultos jóvenes es la leucemia aguda linfoblástica, en la cual se ha observado que el 30% de los pacientes cursan con un cuadro de fibrosis de la médula ósea, lo cual es de mal pronóstico para estos pacientes. El origen de la fibrosis se desconoce, de ahí el interés en estudiar su patogénesis. En el presente trabajo se muestra que los fibroblastos procedentes de la médula ósea con fibrosis de pacientes con leucemia aguda linfoblástica, presentan una proliferación anormal en cultivo, en comparación con los fibroblastos de donadores normales. Esto se demostró tanto por la presencia de una mayor proliferación detectada mediante la observación directa de los cultivos, como por el análisis de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina. Asimismo, se encontró que las células de leucemia de pacientes con fibrosis, secretan el factor estimulador de colonias de macrófagos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y la interleucina 1 alfa, siendo esta última la que se detectó en mayor cantidad. Únicamente los medios condicionados de las células de leucemia de pacientes con fibrosis, fueron capaces de estimular tanto la proliferación de sus propios fibroblastos como de fibroblastos de donadores normales. El bloqueo de la actividad de la interleucina 1 alfa mediante anticuerpos, demostró que esta citocina es la principal molécula responsable de la proliferación. Aunque es necesario estudiar a fondo el problema, estos datos sugieren que la fibrosis de la médula ósea asociada a leucemia aguda linfoblástica, se puede deber tanto a alteraciones intrínsecas de los fibroblastos, así como a una mayor producción de citocinas por las células de leucemia que estimulan la proliferación de los fibroblastos. El conocimiento de los mecanismos involucrados en la patogenia de este padecimiento, permitirá implementar estrategias terapéuticas con las que se logre mejorar el pronóstico de estos enfermos.

## ABREVIATURAS

LAL	Leucemia aguda linfoblástica
AML	Leucemia mioeloide aguda
LGC	Leucemia granulocítica crónica
FMO	Fibrosis de la médula ósea
MO	Médula ósea
PSC	Células seminales pluripotenciales
CFU-S	Unidad formadora de colonias de bazo
CFC-HPP	Células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo
CFU-GEMM	Unidad formadora de colonias de megacariocitos, macrófagos, eritrocitos y granulocitos.
CFU-L	Unidad formadora de colonias linfoides
BFU-E	Unidad formadora del brote eritroide
CFU-Meg	Unidad formadora de colonias de megacariocitos
CFU-GM	Unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos
CFU-Eo	Unidad formadora de colonias de eosinófilos
CFU-Bas	Unidad formadora de colonias de basófilos
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides
CFU-G	Unidad formadora de colonias de granulocitos
CFU-M	Unidad formadora de colonias de macrófagos
HGF's	Factores de crecimiento hematopoyéticos
CSF's	Factores estimuladores de colonias
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
EPO	Eritropoyetina
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
SCF	Factor de crecimiento de células seminales
IFN	Interferón
TNF	Factor de necrosis tumoral
TGF	Factor de crecimiento transformante
HL-60	Línea leucémica promielocítica
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
FAB	Comité franco-Americano-Británico
G6PD	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
McLN	Medio condicionado de linfocitos normales
McLNf	Medio condicionado de linfoblastos de paciente sin fibrosis
McLf	Medio condicionado de linfoblastos de paciente con fibrosis
&IL-1 $\alpha$	Anticuerpo monoclonal dirigido contra interleucina 1 alfa
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos

## INTRODUCCION

La hematopoyesis es el proceso biológico mediante el cual se forman todas las células de la sangre. En la vida posnatal el órgano hematopoyético es la médula ósea (MO), la cual esta formada por tres componentes principales: las células precursoras sanguíneas o hematopoyéticas, que comprenden la mayoría de los elementos celulares; las células estromales, entre las que se encuentran fibroblastos, células endoteliales y adipocitos, las cuales colaboran en la proliferación de las células hematopoyéticas; y un sistema vascular responsable de la salida de los elementos sanguíneos de la zona medular (Allen y Dexter, 1990). De acuerdo a lo anterior, se puede decir que la hematopoyesis es producto de una interacción muy estrecha entre las células hematopoyéticas y el estroma (Marsh, 1990; Florensa y Woessner, 1994).

Cuando se presentan alteraciones en el proceso hematopoyético esto puede provocar el desarrollo de enfermedades como la leucemia. La leucemia es un desorden proliferativo maligno de las células hematopoyéticas de la MO, las cuales desplazan de manera progresiva a las células normales, propiciando así una marcada disminución de estas últimas (Sievers, 1995). En nuestro país, las enfermedades hematológicas malignas ocupan el primer lugar de incidencia entre las neoplasias que afectan a la infancia, y el cuarto lugar de todos los tipos de cáncer (10.6%) en adultos, después del cáncer cérvico-uterino, el de mama y el de piel (Registro Nacional de Cáncer, 1993).

Una variedad muy frecuente en niños y en adultos jóvenes es la leucemia aguda linfoblástica (LAL). Este tipo de leucemia se caracteriza por un exceso de células inmaduras linfopoyéticas (blastos) de la MO que presentan diversas alteraciones moleculares, entre

ellas la sobreexpresión del producto del oncogen *c-myc* (Miranda, 1991). Los linfoblastos transformados se acumulan y permanecen en la médula, pero eventualmente un número variable de ellos emergen hacia el torrente sanguíneo (Head, 1995). Algunos pacientes con esta enfermedad presentan fibrosis medular (FMO) caracterizada por una proliferación masiva de las células fibroblásticas estromales de la MO (Thiele, 1991b). Dichas células aumentan progresivamente en cantidad, contribuyendo al desplazamiento y disminución de los otros constituyentes medulares normales (McCarthy, 1985; Reilly, 1994; Ozen, 1997). A nivel clínico, este padecimiento dificulta el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento de los pacientes. El resultado final es un mal pronóstico para los pacientes que presentan este cuadro (Reissenweber, 1995; Sahu, 1997).

Aunque el origen de la fibrosis se desconoce, en pacientes con leucemia megacarioblástica asociada a ésta, se ha encontrado una proliferación e infiltración de megacarioblastos en la MO. Dichos megacarioblastos tienen la capacidad de secretar citocinas, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual estimula la proliferación de los fibroblastos y por lo tanto favorece la fibrosis (Kimura, 1988). Asimismo, en pacientes con leucemia linfocítica crónica y FMO, se ha observado que la Interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) producida por las mismas células leucémicas, induce la proliferación de los fibroblastos de la MO (Kimura, 1993).

Se sabe que las células hematopoyéticas poseen la capacidad de secretar citocinas que inducen la proliferación de las células estromales, de hecho glicoproteínas como el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), no sólo regulan la proliferación y diferenciación

de las células precursoras hematopoyéticas, sino que a su vez presentan la capacidad para inducir a las células estromales a producir citocinas y con ello estimular la hematopoyesis (Arend y Malyak, 1992; Roy, 1992).

Con base en estos antecedentes y tomando en cuenta que en algunos casos de LAL se presenta FMO, es posible suponer que el aumento en la producción de ciertas citocinas secretadas por las células leucémicas, pudiera ser responsable de la proliferación descontrolada de los fibroblastos observada en la FMO. En el presente trabajo se evaluó si las células leucémicas presentes en LAL, participan mediante la secreción de citocinas en el desarrollo de la FMO, específicamente se estudió la proliferación de los fibroblastos provenientes de pacientes de LAL con fibrosis, así como también la secreción de citocinas por las células de leucemia que pudieran inducir la proliferación de los fibroblastos de la MO.

## MARCO TEORICO

### LA MEDULA OSEA COMO ORGANO HEMATOPOYETICO

#### A. ORIGEN EMBRIONARIO.

La formación de células sanguíneas se lleva a cabo en los primeros días de vida intrauterina, a través de un proceso conocido como hematopoyesis. Este proceso se inicia cuatro semanas después de la concepción en el tejido mesoblástico extraembrionario, particularmente en el saco vitelino, donde se forman entidades celulares denominadas islotes sanguíneos o de Pander-Wolff. Estos islotes hemangioblásticos funcionan temporalmente dado que tienen periodos de proliferación activa y después decaen gradualmente, permitiendo que otro islote en formación tome nuevamente dicha función (Jandl, 1991; Hirsch, 1996).

Este patrón hematopoyético se mantiene constante hasta el segundo mes de vida fetal y posteriormente se mueve a sitios intraembrionarios como el hígado y luego el bazo. En el hígado se inicia la hematopoyesis a las siete semanas de vida embrional y alcanza su máxima intensidad entre el cuarto y quinto mes y posteriormente decae súbitamente. Por su parte el bazo inicia su actividad hematopoyética un mes después que el hígado y generalmente termina al séptimo mes de la concepción (Erslev y Gabuzda, 1985; Hirsch, 1996).

El último órgano hematopoyético en el embrión es la médula ósea, cuya actividad inicia durante el cuarto mes coincidiendo con la aparición de la circulación placentar (Figura 1). En la médula ósea el tejido mesenquimal original da lugar a las células precursoras hematopoyéticas y a las células endoteliales que delimitan los vasos

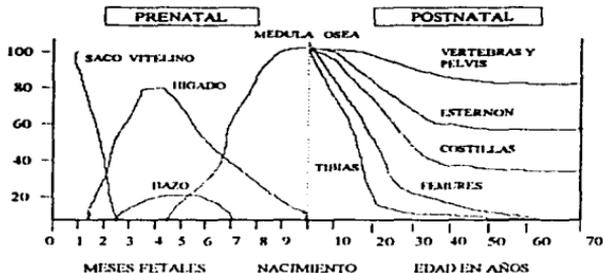


Figura 1. Desarrollo del tejido hematopoyético antes y después del nacimiento. Después del nacimiento aproximadamente un 90% de la hematopoyesis se mantiene en la médula del esqueleto central. Tomado de Erslev y Gabuzda, 1985.

capilares mas tempranos. Asimismo, las células mesenquimales son precursoras de células reticulares primitivas y mas tarde de los primeros macrófagos y células adiposas (Christensen, 1989).

Como observamos la hematopoyesis es un fenómeno migratorio que se establece finalmente en la médula ósea donde permanece constante durante la vida adulta (Haynesworth, 1996). Las condiciones adecuadas para la formación de las células sanguíneas, son producto de una relación muy estrecha entre los componentes medulares.

## *B. COMPONENTES DE LA MEDULA OSEA*

En el interior de un hueso completamente formado, la médula existe como un tejido conectivo flojo altamente vascularizado y enriquecido celularmente. Estructuralmente, consiste de cuatro componentes importantes: las células sanguíneas ó hematopoyéticas, que comprenden la mayoría de los elementos celulares; un componente estromal altamente organizado que mantiene la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas; una matriz extracelular que permite unir y presentar factores de crecimiento hematopoyéticos a las células precursoras y un sistema vascular responsable de la entrada de nutrientes y la salida de elementos sanguíneos de la zona medular (Allen y Dexter, 1990).

### 1. Células Hematopoyéticas.

En la médula ósea las células hematopoyéticas se distribuyen de manera heterogénea, dado que se presenta una mayor concentración celular cerca de la superficie del hueso en relación al centro de la médula, donde existe un menor número de ellas. Las células hematopoyéticas pueden ser divididas en cuatro compartimentos celulares dependientes de la madurez: a) células pluripotenciales primitivas, con alta capacidad de autorenovación; b) células multipotenciales con cierta capacidad de autorenovación y que dan lugar a la formación de los primeros precursores comprometidos a los linajes mieloides y linfoides; c) células precursoras comprometidas, sin capacidad de autorenovación y con un linaje determinado y d) células maduras, con funciones especializadas que disminuyen o pierden su capacidad de proliferar (Jandl, 1991; Huyhn, 1995; Han, 1995; Civin, 1996) (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación propuesta para las células hematopoyéticas.**

<b>COMPARTIMENTO</b>	<b>TIPO CELULAR</b>
<b>Células Seminales Pluripotenciales</b>	<b>PSC</b>
<b>Células Seminales Multipotenciales</b>	<b>CFU-S CFU-GEMM CFU-L CFC-HPP</b>
<b>Células Precursoras Comprometidas</b>	<b>BFU-E CFU-Meg CFU-GM CFU-Eo CFU-Bas Célula Pre-B Célula Pre-T CFU-E CFU-G CFU-M</b>
<b>Células Maduras</b>	<b>Eritrocito, Megacariocito Neutrófilo, Macrófago Eosinófilo, Basófilo Linfocitos B y T</b>

**PSC**, Célula seminal pluripotencial; **CFU-S**, Unidad formadora de colonias de bazo; **CFU-GEMM**, Unidad formadora de colonias de megacariocitos, macrófagos, eritrocitos y granulocitos; **CFU-L**, Unidad formadora de colonias linfoides; **HPP-CFC**, Células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo; **BFU-E**, Unidad formadora del brote eritroide; **CFU-Meg**, Unidad formadora de colonias de megacariocitos; **CFU-GM**, Unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos; **CFU-Eo**, Unidad formadora de colonias de eosinófilos; **CFU-Bas**, Unidad formadora de colonias de basófilos; **CFU-E**, Unidad formadora de colonias eritroides; **CFU-G**, Unidad formadora de colonias de granulocitos; **CFU-M**, Unidad formadora de colonias de macrófagos. Tomado y modificado de Jandl, 1991.

En lo que se refiere a las células seminales pluripotenciales, se ha observado que se encuentran fuera del ciclo celular y que solamente entran a éste como consecuencia de alguna demanda fisiológica ocasionada por la continua muerte celular o por alguna

infección (Abkowitz, 1996). Por su parte, se ha puesto en evidencia que en la médula ósea existe una diferencia en la tasa de proliferación celular, siendo mayor en las células progenitoras que en las células seminales (Hodgson y Bradley 1980; Wolf y Preistley, 1986). Biológicamente resulta explicable este hecho pues es de esperarse que la población de células precursoras tenga que amplificarse para cubrir las demandas de células sanguíneas necesarias para el organismo, a diferencia de las células seminales que se autoremuevan para mantener una dotación constante de las mismas y mantener la hematopoyesis durante largo tiempo.

## 2. Estroma.

El estroma, permanece y funciona como base sobre la cual los progenitores sanguíneos pueden proliferar y diferenciarse (Novitzky, 1995a; Muller-Sieburg, 1995). Está constituido por células reticulares, células adventicias y por adipocitos. Las células reticulares, como los fibroblastos y macrófagos, representan las células estromales básicas de las áreas hematopoyéticas de la médula ósea (Westen y Bainton, 1979; Allen y Dexter, 1990; Dorshkind, 1990). Ellas son las células dominantes del estroma medular con morfología dendrítica en forma de hojas ramificadas, lo que permite formar una malla esponjosa sobre la que descansan las células hematopoyéticas primitivas (Figura 2). Las células adventicias representan el segundo componente celular, entre ellas se encuentran las células endoteliales y basales; éstas cubren las áreas de la superficie luminal de los sinusoides vasculares y su principal papel es regular el flujo de células hematopoyéticas maduras al torrente sanguíneo (Chamberlain, 1975; Becker y DeBruyn, 1976; Fleischman, 1995). El

tercer componente del estroma es el adipocito, típico de la médula ósea no-hematopoyética grasa y probablemente derivado de las células adventicias al acumular cantidades considerables de grasa (Delikat, 1995). Estas células tienen como papel principal recubrir los espacios en los sitios donde la hematopoyesis ha degenerado (Weiss, 1976; Weiss, 1981). Actualmente se ha demostrado que las células estromales son capaces de producir citocinas como G-CSF, SCF, M-CSF, IL-6 e IL-11, las cuales participan en la proliferación y diferenciación de los precursores hematopoyéticos (Haynesworth, 1996; Cluitmans, 1995).

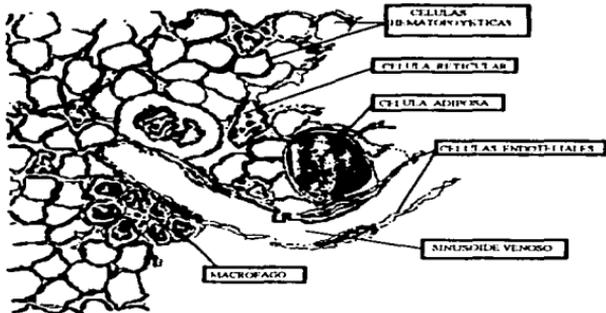


Figura 2. Representación esquemática de los elementos estromales de la médula ósea in vivo. El sinusoides venoso en el centro está limitado con células endoteliales y está recubierto sobre su superficie adventicia por varias capas de células reticulares. Las células reticulares se ramifican en el espacio extravascular formando una red sobre la cual se mantienen las células hematopoyéticas. Se muestra también una célula adventicia que ha acumulado grasa (célula adiposa). Los macrófagos están íntimamente asociados con las células hematopoyéticas en desarrollo. Tomado de Allen y Dexter, 1990.

### 3. Matriz Extracelular.

Los componentes de la matriz extracelular consisten en sustancias secretadas por las propias células estromales e incluyen fibronectina, colágeno, laminina y algunos glicosaminoglicanos (Zuckerman y Wicha, 1983; Wight, 1986). Estas moléculas son responsables de la adherencia de una célula con otra y con su substrato, asimismo, han sido implicadas en ejercer efectos microambientales en la hematopoyesis (Weinstein, 1989; Hurley, 1995).

Estudios realizados *in vitro* se han dirigido a discernir cual o cuales de estas moléculas afectan de manera crucial el desarrollo de las células hematopoyéticas (Clark, 1995). Actualmente, existen datos experimentales que demuestran la propiedad de las moléculas de la matriz extracelular para unirse a factores de crecimiento hematopoyéticos. Así, se ha observado que estos componentes tienen la capacidad de "compartamentalizar" a factores tales como la interleucina 3 (IL-3) y el factor estimulador de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) (Gordon, 1987; Ruoslahti y Yamaguchi, 1991). Sin embargo, uno de los problemas que planteó esta situación fue conocer si esta unión estaba asociada con algún componente extracelular en la membrana de las células estromales, o si tenía que ver con las moléculas de matriz producidas por las mismas células estromales y que son secretadas al medio. Debido a que la adhesión entre las células estromales y las hematopoyéticas seminales es fundamental para que se realice la hematopoyesis, resultó interesante establecer que la unión ocurría a nivel de moléculas presentes en la membrana de las células estromales (Allen y Dexter, 1990).

Otros grupos de investigación han publicado resultados similares, en los cuales se demuestra que el glicosaminoglicano sulfato de heparán presente en la membrana de las células estromales, tiene la propiedad de unir GM-CSF e IL-3 y presentarlos a las células hematopoyéticas. Inclusive demostraron que dicha propiedad era fuertemente disminuida si se utilizaba la enzima heparinasa (Roberts, 1988).

#### 4 Sistema Vascular.

La médula ósea activa tiene una arteria nutricia que da lugar a arteriolas radiales, las cuales desembocan en sinusoides vasculares. A partir de aquí, la sangre alcanza las vénulas y la vena longitudinal central. Este sistema vascular tiene varios tipos celulares asociados a él (Wilkins, 1995). Las arteriolas pequeñas están revestidas de endotelio no fenestrado, rodeado de células de músculo liso y de una lámina basal, colágeno y fibras reticulares. Los capilares tienen endotelio con fenestraciones pequeñas, pericitos y una lámina basal. A diferencia del endotelio capilar, el endotelio sinusoidal carece de una lámina basal lo cual permite el paso constante de células que han alcanzado una madurez adecuada hacia la circulación. A las células que constituyen este tipo de endotelio se les denomina células litorales. Así, podemos decir que existen 5 tipos de células que constituyen al sistema vascular de médula: tres tipos de endotelio (arterial, capilar y litoral) y dos tipos de células basales que revisten las paredes de los vasos (células de músculo liso y pericitos) (Allen y Dexter, 1990). Las células endoteliales pueden ser la mayor fuente de citocinas en la médula ósea (Grosset, 1995).

### 5. Microambiente Hematopoyético.

Tal vez el primer dato experimental con el que se cuenta acerca de la participación del microambiente hematopoyético en la génesis de las células hematopoyéticas fue el que observó Russel en cepas de ratones que padecían de anemias hereditarias. Al analizar las cepas **S1 (Steel)** y **W (White)** ambas con anemia, encontró que la cepa **S1** se caracterizaba por presentar un microambiente celular hematopoyético defectuoso, el cual se demostraba por su incapacidad de estimular la proliferación y desarrollo de colonias mieloides en su bazo cuando los ratones habían sido letalmente irradiados e inoculados con células de médula ósea normal. Por otro lado, la cepa **W** presentaba un defecto a nivel de las células seminales más que en el microambiente hematopoyético, lo cual se ponía en evidencia cuando ratones normales letalmente irradiados, eran inoculados con células de médula ósea provenientes de ratones **W**, las cuales fallaban en reconstituir la hematopoyesis (Russel, 1979).

Aunque los resultados obtenidos por Russel evidencian de manera clara el papel del microambiente en la regulación de la hematopoyesis, una de las pruebas más contundentes de su participación en la formación de células sanguíneas la obtendría unos años después Dexter al utilizar los cultivos a largo plazo desarrollados por él mismo (Dexter y Heyworth, 1994). Esta técnica permite el establecimiento de monocapas de células estromales provenientes de médula ósea, las cuales son capaces de favorecer un microambiente propicio para mantener un proceso hematopoyético continuo por periodos prolongados de 3 a 4 meses (Novitzky, 1995b).

Mediante los cultivos a largo plazo fue posible producir una "cura" en las cepas arriba citadas, al crecer células hematopoyéticas de la cepa S1 (normales por sí mismas pero con un microambiente defectuoso) sobre monocapas de células estromales provenientes de la cepa W, las cuales tienen un microambiente normal pero células precursoras hematopoyéticas defectuosas (Dexter y Moore, 1977). Con el análisis molecular de las alteraciones presentes en ambas cepas, se encontró que existe una mutación en la cepa W relacionada con el proto-oncogen c-kit que codifica para un receptor de tipo tirosina cinasa (Chabot, 1988), mientras que en la cepa S1 también se presenta una mutación que afecta el gen que codifica para el factor Steel (SCF), ligando de c-kit (Zsebo, 1990). Con ello se demostró que en trasplantes intergenotípicos, los ratones S1 no pueden ser curados de sus problemas hematológicos por medio de trasplantes de médula ósea proveniente de ratones W; sin embargo, el trasplante de ratones W con médula ósea de ratones S1 resultó en su reconstitución hematológica.

Así, los defectos de los ratones W se encuentran inherentes en las células hematopoyéticas al afectarse el receptor del SCF (c-kit), mientras que el defecto en los ratones S1, está en el SCF presente en la membrana de las células estromales que constituyen el microambiente medular. Estos resultados e investigaciones posteriores, evidencian la interdependencia a nivel celular entre las células hematopoyéticas y las estromales para una adecuada producción sanguínea (Bussolino, 1994; Eifgenbein, 1995).

Debido a lo anterior, la médula ósea es un órgano que posee el microambiente favorable y los elementos necesarios para regular la producción de las células sanguíneas a lo largo de toda la vida.

## PRODUCCION DE CELULAS SANGUINEAS

### A. COMPONENTES SANGUINEOS Y SUS PRECURSORES

La sangre es un tejido coloidal constituido por plasma y distintos tipos celulares (eritrocitos, linfocitos, monocitos, granulocitos y plaquetas) que se encuentran suspendidos en el plasma sanguíneo. La sangre circula por el sistema vascular realizando funciones como el transporte de oxígeno y de sustancias nutritivas a todos los tejidos del cuerpo, así como de los productos de excreción y de desecho; además también participa como medio de transporte en el sistema endócrino (Weiss, 1977).

Los eritrocitos son los encargados de transportar la hemoglobina por todo el cuerpo llevando así el oxígeno a todo el organismo. Las plaquetas son corpúsculos derivados de células gigantes denominados megacariocitos, los cuales tienen la principal función de coagular la sangre en situaciones de hemorragias; mientras que los leucocitos se encargan de la defensa de nuestro organismo (Brow, 1976).

Las células blancas agrupan cinco tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos-macrófagos. Los tres primeros se conocen genéricamente como granulocitos, poseen numerosos lisosomas y vesículas secretoras o gránulos, recibiendo su nombre de acuerdo a sus propiedades de tinción. Los neutrófilos forman el grupo más numeroso, engloban, lisan y digieren bacterias. Una característica de estas células es tener un período de vida corto ya que por lo general mueren después de hacer su función o durante el ataque al agente infeccioso (Peterson, 1992).

Por su parte, los linfocitos junto con los macrófagos constituyen básicamente el sistema inmune. Existen dos tipos de linfocitos con funciones diferentes: los linfocitos B,

que producen anticuerpos (Ac) como respuesta ante un antígeno (Ag) dando lugar a la inmunidad humoral; y los linfocitos T, que son los responsables de la respuesta inmune celular, actuando mediante una interacción membrana-membrana al detectar al Ag (Donnenberg, 1995). Los monocitos son los fagocitos mononucleares circulantes que al abandonar el torrente sanguíneo se transforman en macrófagos, los cuales eliminan por fagocitosis a los microorganismos invasores, cuerpos extraños y residuos celulares (Arai, 1992).

Todas las células sanguíneas que circulan en la sangre periférica son producidas en la médula ósea, en donde la mayoría de las células presentan estadios de maduración diferentes. (Heath, 1990).

Con el desarrollo de técnicas de crecimiento de células de médula ósea en cultivos *in vitro*, fue posible estudiar el desarrollo de las células precursoras hematopoyéticas (Pluznik y Sachs, 1965; Bradley y Metcalf, 1966). De esta manera se han identificado células con capacidades multipotenciales, bipotenciales y monopotenciales, las cuales originan a más de uno, dos y hasta un solo linaje respectivamente (Shrader, 1985; Huyhn, 1995). La CFU-GEMM, es considerada una célula multipotencial ya que favorece el desarrollo de granulocitos, eritrocitos, megacariocitos y monocitos (Johnson y Metcalf, 1977; Hara y Ogawa, 1978; LaCout, 1996). Por lo que se refiere a las células bipotenciales, la primera que se identificó *in vitro* es la que origina a macrófagos y granulocitos y que es conocida como CFU-GM (Pluznik y Sachs, 1966; Huyhn, 1995). De manera posterior, se identificó que los eosinófilos y basófilos se originaban de una célula progenitora diferente de la CFU-GM, designándole por esta razón CFU-Eo y CFU-Bas respectivamente, ambas con características

monopotenciales (Johanson y Metcalf, 1980). Asimismo, han sido identificadas células precursoras de linfocitos B y T denominadas CFU-L (Unidad formadora de colonias linfoides) (Figura 3).

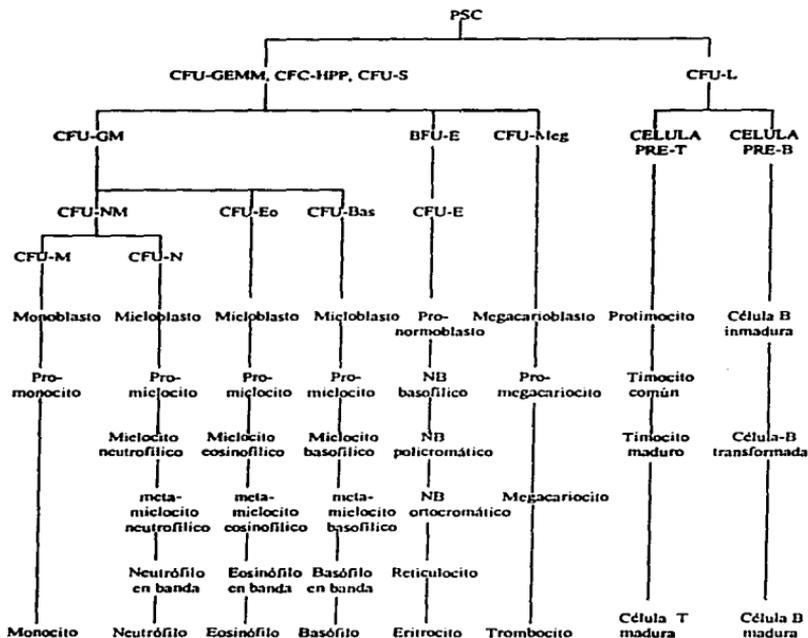


Figura 3. Representación esquemática de la hematopoyesis. PSC, célula seminal pluripotencial; CFU, unidad formadora de colonias; CFC-HPP, célula formadora de colonias de alto potencial proliferativo; BFU, unidad formadora de grupos; S, baso; G, granulocito; E, eritrocito; M, macrófago, Meg, megacariocito; L, linfocito; N, neutrófilo; Eo, eosinófilo; Bas, basófilo; NB, normoblasto. Tomado de Meager, 1991.

## *B. CITOCINAS HEMATOPOYETICAS*

La sobrevivencia, proliferación y diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas, requiere de la continua presencia de moléculas proteicas específicas. Estas proteínas conocidas como factores de crecimiento hematopoyético (HGF's), o citocinas hematopoyéticas han sido identificadas, purificadas, molecularmente clonadas y caracterizadas con funciones específicas a diferentes niveles en las vías de desarrollo de las células sanguíneas y sus progenitores (Tabla 2) (Clark y Kamen, 1987).

En los siguientes párrafos se describen características muy generales y actividades biológicas de las principales citocinas que se han descrito no solo como promotores de crecimiento celular en la hematopoyesis, sino que además, regulan la proliferación de células estromales de la médula ósea y con ello participan activamente en el desarrollo del microambiente hematopoyético necesario para la producción adecuada de las células sanguíneas.

### 1. M-CSF.

Los factores estimuladores de colonias (CSFs), fueron originalmente definidos como glicoproteínas que estimulaban a células progenitoras hematopoyéticas provenientes de médula ósea, a proliferar y diferenciarse hacia colonias de granulocitos maduros y/o macrófagos al ser cultivadas en un medio semisólido (Metcalf y Burgess, 1982). Entre ellos se identificó al factor estimulador de colonias 1 o de macrófagos (CSF-1 ó M-CSF), el cual induce selectivamente la formación de colonias de macrófagos (Stanley, 1979, Das, 1981).

**Tabla 2. Citocinas que modulan la actividad biológica de células hematopoyéticas.**

Familias	Moléculas	Cromosoma	Peso Molecular (Kd)
<b>Factores de crecimiento</b>	GM-CSF	5q23	14-35
	G-CSF	17q11	18-22
	M-CSF	5q33	35 x 2
	EPO	7q11	34-39
	SCF	10	51 x 2
<b>Interleucinas</b>	IL-1	2q	17.5
	IL-2	4q	15-20
	IL-3	5q23	14-28
	IL-4	5q	15-20
	IL-5	5q	21.5 x 2
	IL-6	7q	21-28
	IL-7	8q	25
	IL-8	4q	8-10 x 2
	IL-9	5q	32-39
	IL-10	1	19 x 2
	IL-11	19q	20-23
	IL-12		35-40
	IL-13	5q	12
	IL-14		
IL-15			
<b>Interferones</b>	IFN- $\alpha$	9q	16-27
	IFN- $\beta$	9q	20
	IFN- $\gamma$ *	12q	17 x 2
<b>Factores de Necrosis tumoral</b>	TNF- $\alpha$	6p	17 x 1-3
	TNF- $\beta$ *	6p	20-180 x 3
<b>Factores de Crecimiento transformante</b>	TGF- $\alpha$	2	26
	TGF- $\beta$	19q	12.5 x 2
<b>Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas</b>	PDGF-A	7	14-18 x 2
	PDGF-B	22	16 x 2

CSF, factor estimulador de colonias; GM, granulocito-macrófago; M, macrófagos; G, granulocitos; SCF, factor de células seminales; \* inhibidores de la proliferación.

Los tipos celulares productores de M-CSF son muy diversos y van desde células malignas como las leucémicas, linfomas, mielomas y carcinomas, hasta células normales estromales como fibroblastos y endotelios, además de células hematopoyéticas (Sherr, 1990).

Sus principales células blanco son monocitos, macrófagos, células microgliales, fibroblastos y células progenitoras de macrófagos. Entre sus efectos *in vivo* destacan la producción de fagocitos mononucleares, regulación de la función placentar, actividad antitumoral y la reducción de colesterol en el plasma. También tiene significancia clínica como inductor de la recuperación hematopoyética en pacientes bajo tratamientos de quimioterapia e infecciones (Garmick y Stoudemire, 1990).

## 2. GM-CSF:

El factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) fue inicialmente definido en ensayos *in vitro*, como un factor de proliferación capaz de producir el desarrollo clonal de progenitores granulocito-macrófago normales (Metcalf y Burgess, 1982). Se conoce que un número diferente de tipos celulares producen GM-CSF, predominantemente después de la estimulación por un antígeno o endotoxinas. Entre ellas se tienen a las células T activadas, macrófagos, fibroblastos y a las células endoteliales (Hermann, 1988)

El GM-CSF tiene diversas acciones biológicas entre las que sobresalen la de factor de sobrevivencia para células sanguíneas maduras, como factor de proliferación para células

progenitoras hematopoyéticas y células leucémicas, como factor de diferenciación en líneas de células leucémicas (HL-60) y como activador de células sanguíneas maduras (Erbe, 1990; Fisher, 1988; Hill, 1995). Así, el GM-CSF es capaz de aumentar la citotoxicidad, fagocitosis, adhesión celular y aún funcionar como quimioatrayente.

Ha sido aplicado frecuentemente a nivel clínico posterior a la quimioterapia del cáncer, en el trasplante de médula ósea, en la mielodisplasia, en anemia aplásica, en leucemia mieloide aguda y SIDA y sobre todo en la neutropenia ocasionada por estos padecimientos (Crossier, 1992; Hill, 1995; Vose, 1995).

### 3. PDGF.

El PDGF fue identificado como el principal mitógeno en suero para células de origen mesenquimal. Por sí mismo, es sintetizado como una proteína heterodimérica en megacariocitos, almacenada en los gránulos de las plaquetas y liberado de plaquetas activadas a los sitios de daño en los vasos sanguíneos (Castro-Malaspina, 1981).

El PDGF es sintetizado por células normales y transformadas. Sus fuentes principales son las plaquetas, megacariocitos, monocitos, células endoteliales, células musculares, fibroblastos, células gliales, mieloblastos, células epiteliales de riñón, carcinomas mamarios, meningiomas y algunas líneas celulares (Meager, 1991).

El principal papel del factor de proliferación derivado de plaquetas (PDGF) en aquellas células que presentan su receptor es estimular su proliferación y mantener su viabilidad (Deuel, 1983). Así, su expresión anormal puede ser importante en enfermedades

caracterizadas por una respuesta celular proliferativa como en el caso de la fibrosis (Reilly, 1992).

Se ha encontrado que el PDGF es un fuerte quimioatrayente para monocitos humanos y neutrófilos y también para fibroblastos y células de músculo. Induce la activación de leucocitos polimorfonucleares y monocitos y un incremento en la liberación de colagenasa por fibroblastos en cultivo, así como participa en la reparación de tejido (Tzeng, 1985; Ross, 1986; Thiele, 1991b).

#### 4. IL-1.

La Interleucina 1 (IL-1) es producida por leucocitos en respuesta a infecciones, toxinas microbiales, agentes inflamatorios, productos de leucocitos activados y proteínas de complemento (Dinarello, 1991). Existen dos formas glicosiladas de la IL-1, una forma ácida denominada interleucina-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) cuyo punto isoeléctrico es de 5 y una forma neutra, la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), con punto isoeléctrico de 7.2. Ambas moléculas en su forma madura tienen un peso molecular de 17, 000 daltones (March, 1985).

La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  se unen al mismo receptor a pesar de no tener mucha homología. Los genes que codifican para ambos tipos de interleucina se localizan en el brazo largo del cromosoma 2, sitio en que también se localizan los genes para los dos tipos de receptores que fijan a la IL-1 (IL-1RI, IL-1RII) (Webb, 1986). La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  se unen al IL-1RI y parece ser el único receptor capaz de promover actividad biológica, mientras que el receptor IL-1RII en forma soluble o adherido a membrana, fija preferentemente IL-1 $\beta$  pero sin promover actividad biológica (Sims, 1993).

IL-1 $\alpha$  es la principal forma de IL-1 adherida a membrana y se le responsabiliza de ser la molécula sobre la cual se unen los linfocitos a los macrófagos para formar rosetas en el timo, sin embargo también se encuentra a la IL-1 $\alpha$  en circulación (Dinarelo, 1994a). En lo que respecta a IL-1 $\beta$ , es una molécula preferentemente de secreción. La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  pueden encontrarse en el sobrenadante de los cultivos y fluidos corporales, sin embargo la forma más abundante es el de la IL-1 $\beta$  (Dinarelo, 1994b).

Aunque en un inicio se consideró que la IL-1 era producida genéricamente por los leucocitos, finalmente se estableció que los principales productores de esta molécula eran los monocito-macrófagos tanto en humano como en ratón (Kovacs, 1987); sin embargo ahora se conoce que también es liberada por los neutrófilos, linfocitos T y B, keratinocitos, células de cerebro de rata, microglías, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y células mesenquiales de riñón (Endres, 1989). Existen varios agentes que promueven la expresión del gen de la IL-1, sin embargo es conveniente resaltar que los lipopolisacáridos (LPS) y citocinas como la propia IL-1, IL-6 e IFN, son los factores más enunciados como principales inductores de la expresión del gen de la IL-1.

Existen muchos efectos biológicos mediados por la IL-1, de los cuales mencionaremos solo algunos. La IL-1 induce la expresión de genes de la IL-8, su propio gen (Dinarelo, 1987) y de proto-oncogenes como c-fos y c-jun (Muegge, 1993). Sin embargo parece regular negativamente la expresión de genes como el de la albúmina y el citocromo p450 (Ghezzi, 1986). A nivel del sistema nervioso central, la IL-1 actúa como un poderoso pirógeno ya que provoca fiebre (Tewari, 1990). Se han detectado IL-1R distribuidos a través del hipotálamo incluso se ha llegado a postular que estos receptores se localizan sobre

las proyecciones neuronales entre las expansiones de las células endoteliales que constituyen la barrera hemato-encefálica, de tal forma que las neuronas reciben un estímulo directo de la IL-1 (Coceani, 1988).

La IL-1 es un potente inhibidor de la síntesis de glicosaminoglicanos y colágena, componentes de la matriz extracelular y constituyentes de los cartilagos. Por otro lado la IL-1 también induce la síntesis de metaloproteasas y gelatinasas las cuales contribuyen a la destrucción del cartilago (Krane, 1990; Dayr, 1986). La IL-1 induce la proliferación de keratinocitos, fibroblastos, células mesenquiales, células de músculo liso, células gliales y algunas células tumorales (Kohase, 1987; Libby, 1988). La IL-1 también afecta la proliferación de células hematopoyéticas, aunque parece ser mediada via inducción a la producción de factores hematopoyéticos como el GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3 e IL-6 por las células estromales de médula ósea humana y de ratón (Bagby, 1989, Fibbe and Falkenburg, 1990; Lilly, 1996). Otra forma de incidir en la proliferación de las células precursoras hematopoyéticas es sinergizar con IL-3, IL-6, G-CSF y GM-CSF para la formación de colonias de linaje celular específico (Bradley, 1989).

Cuando se presentan alteraciones en los mecanismos de producción hematopoyética, esto puede provocar el desarrollo de enfermedades hematológicas como la leucemia.

## LEUCEMIAS Y BIOLOGIA DE LA LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA

Se considera que las leucemias son padecimientos proliferativos malignos de las células de la médula ósea hematopoyética, donde cualquiera de las células que normalmente se originan en ella, pueden en un momento dado, dar lugar a un cuadro leucémico, es decir, la aparición de células inmaduras que normalmente no se presentan en la sangre circulante, ello como una consecuencia de su hiperproducción a partir de un clon maligno de la médula ósea, propiciando así una falta de formación de células biológicamente activas (Jandl, 1991). De acuerdo a un criterio puramente morfológico, las leucemias inicialmente se clasifican en: a) agudas, en donde se presentan más del 5% de blastos en sangre periférica y más del 30% en la médula ósea (Catovsky, 1991); b) crónicas, con menos del 5% de blastos en sangre periférica e igual cantidad en médula ósea, pero con un elevado número de formas intermedias de maduración (Dreazen, 1988).

El diagnóstico definitivo de una leucemia se hace mediante la punción de la médula ósea, en donde además se puede identificar el tipo morfológico, tanto de las formas agudas como de las crónicas. A nivel internacional se formó el Comité Franco-Americano-Británico (FAB) para unificar los criterios morfológicos y clasificar citomorfológicamente a las leucemias. Con estos criterios se puede llegar a una concordancia en el diagnóstico morfológico hasta del 80%. En la tabla 3 se consideran los principales tipos aceptados. Las células mieloides y linfoides inmaduras predominan en las leucemias mielocíticas y linfocíticas respectivamente.

La leucemia mielocítica aguda (AML) es un desorden clonal maligno originado a partir de una célula precursora multipotencial (CFU-GEMM) o bien, de células

**Tabla 3. Clasificación de las leucemias.**

	<b>AGUDAS</b>	<b>CRONICAS</b>
	L1 (linfoblastos pequeños)	
<b>LINFOBLASTICA</b>	L2 (linfoblastos grandes) L3 (Burkittoides)	<b>LINFOCITICA</b>
	M0* (Indiferenciada)	
	M1 (Mieloblástica pura)	
	M2 (Mieloblástica con diferenciación)	
<b>MIELOIDE</b>	M3 (Promielocítica)	<b>MIELOCITICA O</b>
	M4 (Mielomonoblástica)	<b>MEJOR CONOCIDA</b>
	M5 (Monoblástica)	<b>COMO GRANULOCITICA</b>
	M6 (Eritroleucemia)	
	M7* (Megacarioblástica)	

\* No tienen imagen morfológica característica, solo se identifican con Ac monoclonales, para la primera el CD34 y la segunda Cdw41, Cdw42 y CD61. Tomado de Gutiérrez, 1996.

progenitoras comprometidas al linaje mieloide (Fialkow, 1987; Johnson, 1994). Se ha observado que en jóvenes y niños la AML está relacionada a la CFU-G y la proliferación maligna da lugar a una acumulación de mieloblastos o promielocitos que detienen su camino de diferenciación (Griffin, 1986; Stark, 1995). En adultos, algunas pruebas de marcadores de superficie G6PD, y análisis de DNA han detectado que la lesión clonal ocurre en la

CFU-GEMM y con ello el defecto proliferativo se puede expresar en la línea mieloide, monocítica, eritroide, megacariocítica o en varias de ellas (Jasmin, 1988; Sievers, 1995). La lesión clonal en leucemia mieloide crónica, también conocida como leucemia granulocítica crónica (LGC), ocurre en la célula más primitiva o célula seminal y el bloqueo parcial en la diferenciación de las células malignas puede involucrar a elementos tanto linfoides como mieloides (Kurzrock, 1988).

Por su parte, la leucemia aguda linfoblástica (LAL) es una enfermedad clonal que surge en las células precursoras linfopoyéticas de la médula ósea. Los linfoblastos transformados se acumulan y permanecen en la médula pero eventualmente un número variable de ellos emergen hacia el torrente sanguíneo (Greaves, 1986a). Aproximadamente el 20 % de todos los casos de LAL son células linfocíticas de tipo T, mientras que los casos restantes son células neoplásicas pre-B (Le Bien, 1989). El origen de la alteración en LAL puede ser en la CFU-L, ello debido a la detección de marcadores de linaje linfocítico en los blastos transformados, sin embargo, en algunos pacientes de mayor edad, la presencia de marcadores mieloides y linfoides implica que el daño se localiza en las células pluripotenciales (Kurtzberg, 1989; Boldt, 1994).

Tres subclases morfológicas de LAL se han especificado por el criterio FAB. El subtipo L1, se encuentra predominantemente en niños de 15 años de edad o menos, donde los linfoblastos son uniformemente pequeños, con un núcleo redondo u oval y rodeado por una capa delgada de citoplasma agranular basofílico. La subclase L2 ocurre principalmente en adultos; los linfoblastos son heterogéneos pero más grandes que en la L1 y con citoplasma más abundante y nucleolos más prominentes. La tercera subclase L3 es poco

frecuente (de Burkitt), cuyos blastos leucémicos son grandes, pleomórficos y con un gran número de vacuolas (Head, 1995).

Las causas de LAL son desconocidas, sin embargo altos niveles de radiación (> a 100 cGy), como en los sobrevivientes japoneses de la bomba atómica en 1945, aumentan 25 veces el riesgo de LAL, sin embargo, no hay evidencia de que bajos niveles de radiación propicien esta enfermedad. Por otra parte, en algunos casos parecen existir factores hereditarios (Greaves, 1986b; Rubnitz, 1996), por ejemplo, se ha encontrado que en síndromes de inestabilidad cromosómica heredados, los pacientes tienen un mayor riesgo (de 100 a 200 veces más) para desarrollar la enfermedad. Asimismo, las técnicas de bandedo de alta resolución han revelado anomalías cromosómicas clonales en aproximadamente 90% de los pacientes (Sandberg, 1994; Rubnitz, 1996), y se ha observado la presencia del isocromosoma 14q en niños (Tusell, 1995).

Se han descrito tres tipos de translocaciones recíprocas en un tercio de la población de adultos y un quinto en la población de pacientes pediátricos: t(9;22), t(4;11) y t(8;14). (Bloomfield, 1983; Drexler, 1995). Aquellos pacientes con la presencia de dichas translocaciones tienen un promedio de vida menor a 12 meses, ello a diferencia de los pacientes que no la presentan, donde la supervivencia es de años o incluso la mitad de ellos se curan (Bloomfield, 1983).

En la actualidad se sabe que la leucemia aguda linfoblástica es una enfermedad que se asocia con cuadros clínicos como la fibrosis de la médula ósea, la cual provoca un estado de mayor gravedad en los pacientes que la desarrollan.

## FIBROSIS DE LA MEDULA OSEA

La fibrosis de la médula ósea se caracteriza por una proliferación masiva de las células fibroblásticas estromales (Jacobson, 1978; Kiyohiko, 1996; Ozen, 1997). Dichas células aumentan progresivamente en cantidad contribuyendo al desplazamiento y disminución de los otros constituyentes medulares normales (Figura 4) (Soll, 1995; Sahu, 1997).

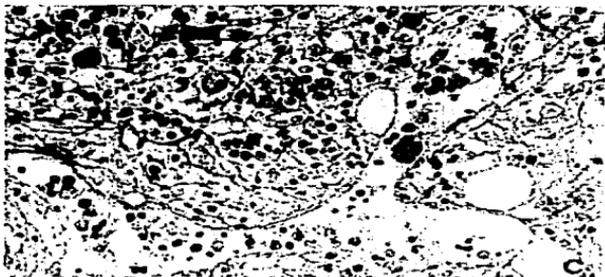


Figura 4. Fibrosis con presencia de eritropoyésis y megacariopoyésis entre las fibras y entre el lumen del sinusoides. (Tomado de Catovsky, 1991)

El estroma medular de pacientes con fibrosis esta caracterizado por un incremento en el colágeno total, incluyendo los tipos I, III, IV, V (Gay, 1984; Reilly, 1985b; Apaja-Sarkkinen, 1986) y VI (Reilly, 1995). Asimismo, glicoproteínas como fibronectina (Reilly, 1985a; Rameshwar, 1996) tenascina (Soini, 1993; Reilly, 1995) y vitronectina (Reilly, 1988) son también típicas de estados avanzados de la enfermedad.

En la médula ósea normal las membranas basales que recubren a los sinusoides sanguíneos, se componen de capas delgadas de colágeno tipo IV y de laminina, mientras que en médula ósea con presencia de fibrosis existe la formación de varias capas de ambos tipos de proteínas lo cual resulta de una marcada angiogénesis y de un incremento moderado en la proliferación de las células endoteliales (Reilly, 1985b; Apaja-Sarkkinen, 1986)

Varias observaciones han sugerido que el linaje megacariocítico es patogenéticamente importante en la producción de la fibrosis, dado que la mayoría de las enfermedades mieloproliferativas asociadas con hiperplasia megacariocítica se correlacionan con su presencia (Kimura, 1988; Kimura, 1989). Así, se sabe que en la leucemia megacarioblástica aguda se presenta la fibrosis medular, en ella, grupos de megacariocitos necróticos o displásicos se asocian con la acumulación de fibras de colágeno (Burkhardt, 1974; Barulli, 1995) Estas células junto con las plaquetas contribuyen a la liberación excesiva de citocinas como el PDGF que es capaz de estimular el crecimiento y división celular de fibroblastos y de ser quimiotáctico para neutrófilos, monocitos y los mismos fibroblastos (Thiele, 1991a; Baker y Manoharan, 1988; Kimura, 1995). Además, los megacariocitos son capaces de producir el factor de plaquetas IV (un inhibidor de la colagenasa) que favorece la acumulación de fibras de colágeno y por consiguiente la compactación de la médula (Sacchi, 1986; Romano, 1990; Schmidt, 1995).

Por otra parte, el incremento en síntesis de matriz extracelular observado en la fibrosis, también se ha relacionado con la presencia de megacariocitos dado que éstos pueden secretar TGF- $\beta$  el cual incrementa la expresión de genes que codifican para fibronectina, colágeno tipo I, III y IV (Varga, 1987; Nakamura, 1990; Johnston, 1995), así como

tenascina (Pearson, 1988) y algunos proteoglicanos (Roberts y Sporn, 1990). Además, el TGF- $\beta$  disminuye la síntesis de varias enzimas parecidas a colagenasas y a metaloproteinasas, las cuales degradan la matriz extracelular a la vez que estimula la síntesis de inhibidores de proteasas (Overall, 1989; Rameshwar, 1996), dando por resultado una acumulación de matriz extracelular.

En la leucemia linfocítica crónica, se ha observado que la fibrosis se desarrolla debido a la secreción de IL-1 $\alpha$  por las mismas células de leucemia (Kimura, 1993). Por otra parte, algunos investigadores han sugerido que en la leucemia granulocítica, las células formadoras de colonias de fibroblastos poseen una alta sensibilidad a mitógenos presentes en el suero, lo cual podría ser otro mecanismo que promueve la fibrosis en esta enfermedad (Kimura, 1990). En la leucemia promielocítica crónica se ha descrito que el ácido retinoico, utilizado originalmente para inducir remisión en los pacientes, provoca efectos adversos entre los que se destaca la fibrosis en médula ósea, probablemente a través de la producción secundaria de TGF- $\beta$  (Kiyohiko, 1996).

Aunque en ciertos tipos de leucemia se han establecido algunos de los factores que pueden estar involucrados en el desarrollo de la fibrosis, todavía se desconoce su origen. Por su parte, en LAL aún no ha sido estudiada esta patología.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En nuestro país las enfermedades hematológicas malignas ocupan el primer lugar de incidencia entre las neoplasias que afectan a la infancia y el cuarto lugar de todos los tipos de cáncer (10.6 %) en adultos, después del cáncer cérvico-uterino, el de mama y el de piel (Registro Nacional de Cáncer, 1993).

Hasta un 30% de los pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica presentan fibrosis medular (Mauer, 1989). La fibrosis se caracteriza por una proliferación masiva de las células fibroblásticas estromales de la médula ósea y que trae por consecuencia una disminución de los otros constituyentes medulares normales y una baja producción hematopoyética (Reilly, 1994). A nivel clínico este padecimiento trae consigo algunos problemas, entre ellos, la dificultad de hacer el aspirado de médula ósea para el diagnóstico inicial, lo cual aunado a la pancitopenia severa en sangre circulante, dificulta la integración de los datos para el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento del paciente. Así, la presencia de fibrosis es de mal pronóstico en aquellos pacientes que desarrollan la enfermedad (Thiele, 1995)

Diversas investigaciones sobre el origen de la fibrosis en algunas leucemias, muestran resultados diferentes dependiendo del tipo de leucemia estudiada, por tanto, la patogénesis de esta enfermedad no se ha establecido totalmente. Por su parte, en LAL aún no se conocen los mecanismos involucrados en el desarrollo de este padecimiento, debido a ello, resulta de interés conocer las causas que provocan su presencia en esta leucemia en particular, con la finalidad de que en un futuro se puedan implementar estrategias terapéuticas que permitan mejorar el tratamiento y el pronóstico de estos pacientes.

## **HIPOTESIS**

Sabiendo que las células hematopoyéticas poseen la capacidad de secretar citocinas que inducen la proliferación de las células estromales y tomando en cuenta que en algunos casos de LAL asociada con fibrosis se presenta una proliferación masiva de las células fibroblásticas estromales de la médula ósea, proponemos que el incremento en la producción de ciertas citocinas, secretadas por las mismas células de leucemia, pudiera ser responsable de la proliferación descontrolada de los fibroblastos de la médula ósea en este tipo de leucemia.

## **OBJETIVO GENERAL**

**Evaluar si las células de leucemia de pacientes con LAL producen citocinas inductoras de la proliferación de células fibroblásticas de médula ósea, identificarlas y determinar si esta producción es específica de las células de leucemia de pacientes con fibrosis asociada.**

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1. Determinar la cinética de proliferación de fibroblastos de médula ósea de donadores sanos y de pacientes de LAL con fibrosis.**
- 2. Evaluar si los medios condicionados de linfoblastos de pacientes de LAL con y sin fibrosis medular producen inductores de la proliferación de fibroblastos de médula ósea.**
- 3. Determinar el tipo de inductores presentes en los medios condicionados de las células linfoblásticas.**
- 4. Identificar en los medios condicionados de las células linfoblásticas, el o los inductores de la proliferación de los fibroblastos de médula ósea de pacientes con fibrosis asociada.**

## METODOLOGIA

***Pacientes y obtención de las muestras.*** En el presente estudio se incluyeron biopsias de médula ósea y muestras de sangre periférica de ocho pacientes con el diagnóstico inmunocitomorfológico de LAL con fibrosis de médula ósea, que acudieron al Hospital General de México. También se incluyeron como controles: muestras de sangre periférica de tres pacientes de LAL sin fibrosis, tres biopsias de médula ósea normal y dos muestras de sangre periférica de individuos normales.

***Cultivo de fibroblastos de médula ósea y cinéticas de proliferación.*** La obtención de los fibroblastos se realizó a partir de las biopsias de MO obtenidas de cresta iliaca de pacientes de LAL con fibrosis y donadores normales y en cultivo por explante. Para ello, cada biopsia se fragmentó en pedazos de aproximadamente 0.5 cm de longitud y se colocaron en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y se agregó medio de cultivo RPMI con 15% de suero fetal de bovino. Todas las células se cultivaron bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C y humedad saturante. Después de 15 días de cultivo se realizó la separación de las células fibroblásticas adherentes, utilizando tripsina pancreática tipo II diluida al 0.025% en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (apéndice 1) durante 5 min. y se determinó la concentración celular con una cápsula de Neubauer. Se cultivaron 30 x 10<sup>3</sup> fibroblastos en RPMI 1640 con 15% de suero fetal de bovino, en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> para su expansión. Las células fueron sembradas durante 5 días, al término de los cuales se despegaron y se pasaron a otra caja de cultivo (subcultivo 1). Las células utilizadas en los ensayos experimentales fueron las de los subcultivos 2 y 3.

Para realizar las cinéticas de proliferación, se sembraron los fibroblastos a una densidad de  $10 \times 10^3$  células/ml en cajas de cultivo de 96 pozos, conteniendo 0.2 ml de RPMI 1640 con 15% de suero fetal de bovino por pozo. Simultáneamente se dio un pulso de 20 hr con  $1 \mu\text{Ci/ml}$  de timidina marcada con  $^3\text{H}$ -timidina y se analizó la incorporación. El pulso con  $^3\text{H}$ -timidina, se realizó diariamente en diferentes pozos de cultivo, durante 15 días y por quintuplicado.

***Cultivo de células linfocíticas y obtención de medios condicionados.*** Para la obtención de medio condicionado de células linfocíticas, se extrajo sangre a los pacientes de LAL con fibrosis, previamente identificados por incremento de reticulina en su MO mediante tinciones celulares; igualmente se extrajo sangre a pacientes de LAL sin fibrosis y donadores normales. La sangre heparinizada se centrifugó a 90 g por 10 min. para separar las células del plasma. El botón celular fue colectado y resuspendido en RPMI 1640 y aplicado a un gradiente de densidad (Ficoll-metrizoato de sodio,  $\delta = 1.077 \text{ g/cm}^3$ ) en un volumen de 2:1 con el medio. Se colectaron las células mononucleares localizadas en la interfase y se lavaron dos veces con RPMI 1640 para eliminar el ficoll. Estas células fueron sembradas en botellas de cultivo de  $25 \text{ cm}^2$  con RPMI 1640 al 10% de suero fetal de bovino y cultivadas durante 2 hr, posteriormente se colectaron las células no adherentes. A éstas se les determinó la pureza y el tipo celular presente, mediante preparaciones celulares en portaobjetos teñidas con Giemsa y su posterior conteo morfológico con el uso del microscopio óptico de luz. Las células fueron incubadas a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml y en botellas de cultivo de

25 cm<sup>2</sup> con RPMI 1640 con 2% de suero fetal de bovino durante 2 días. El medio condicionado fue colectado y almacenado a -20°C hasta su uso.

***Evaluación de la actividad inductora de la proliferación de los medios condicionados de células linfocíticas.*** Para evaluar la actividad de proliferación de los medios condicionados de células linfocíticas, se usaron fibroblastos de donadores normales y de pacientes de LAL con fibrosis, los cuales fueron sembrados a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/ml en cajas de 96 pozos, conteniendo 0.2 ml de RPMI 1640 al 15% de suero fetal de bovino por pozo y se cultivaron durante 4 días. Después se retiró el sobrenadante y se adicionaron 100, 50 o 25  $\mu$ l de los diferentes medios condicionados. Unicamente a la cantidad de 100  $\mu$ l de medio condicionado de células linfocíticas de pacientes de LAL con fibrosis, se le adicionaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra la IL-1 $\alpha$  a una concentración de 1:5 (Genzyme, USA). Las células se incubaron durante 24 hr y después se agregó <sup>3</sup>H-timidina (1  $\mu$ Ci/ml) dejando incubar por 20 hr y se cuantificó la radioactividad incorporada en los fibroblastos.

***Ensayo de detección de citocinas presentes en los medios condicionados.*** A los medios condicionados obtenidos del cultivo de las células linfocíticas, se les determinó el tipo de citocinas presentes mediante ensayos de ELISA (apéndice 2) (Kemeny, 1991), concretamente GM-CSF, M-CSF, PDGF e IL-1 $\alpha$ .

***Análisis estadístico.*** Se realizó una prueba de T para determinar diferencias significativas: a) Entre las cinéticas de proliferación de las células fibroblásticas de donadores normales y de

pacientes de LAL con fibrosis; b) En la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina entre fibroblastos estimulados con medio condicionado de células linfocíticas de pacientes de LAL con y sin fibrosis; c) En la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina entre fibroblastos de donadores normales y de pacientes de LAL con fibrosis al ser estimulados con medio condicionado de células linfocíticas de pacientes de LAL con fibrosis; d) En la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en fibroblastos estimulados con 100, 50 y 25  $\mu\text{l}$  de medio condicionado de células linfocíticas de pacientes de LAL con fibrosis; e) En la disminución de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en fibroblastos estimulados con medio condicionado de células linfocíticas de pacientes de LAL con fibrosis, en presencia de anticuerpos dirigidos contra la IL-1 $\alpha$ .

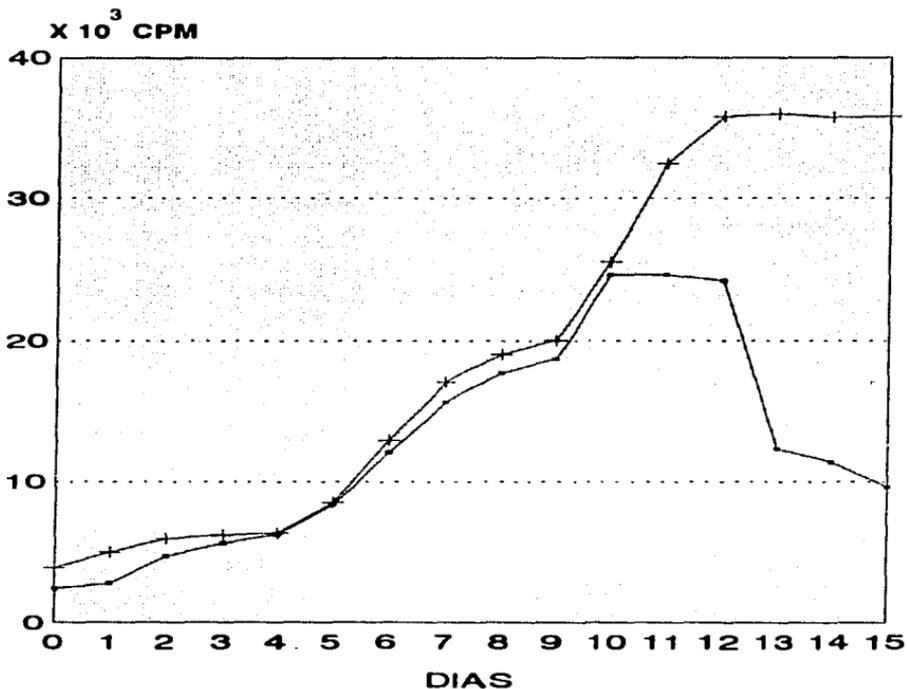
## RESULTADOS

*Los fibroblastos de médula ósea de pacientes de LAL con fibrosis presentan una proliferación aumentada en comparación con la de fibroblastos normales.* La existencia de fibrosis en algunos pacientes con LAL indica la presencia de una proliferación aumentada de los fibroblastos que se encuentran en la MO. Por lo tanto, se obtuvieron biopsias de MO de este tipo de pacientes (Cuadro 1) y se cultivaron las células mediante explantes, para estudiar su proliferación y compararla con la de aquellas procedentes de biopsias de individuos normales. En dos de los ocho pacientes (pacientes 7 y 8) no hubo crecimiento de las células a partir de las biopsias, debido probablemente a la presencia de un número reducido de células viables con capacidad de adherirse a la botella de cultivo, sin embargo, en el resto de los pacientes (pacientes 1 a 6) y en los donadores normales, se logró establecer los cultivos por explante (Figura 1A y B) y obtener fibroblastos para realizar los experimentos que se describen en el presente estudio. En la figura 1D se muestra un cultivo de fibroblastos del paciente 1 de LAL con fibrosis, donde se observa que las células de este paciente, presentaron una proliferación aumentada en comparación con los fibroblastos de un donador normal (Figura 1C), ya que a pesar de tener el mismo tiempo de incubación (11 días), se observa la presencia de varias capas celulares en el cultivo del paciente 1, mientras que las células del donador normal exhiben una monocapa. Este mismo comportamiento se observó en los pacientes 2 a 6.

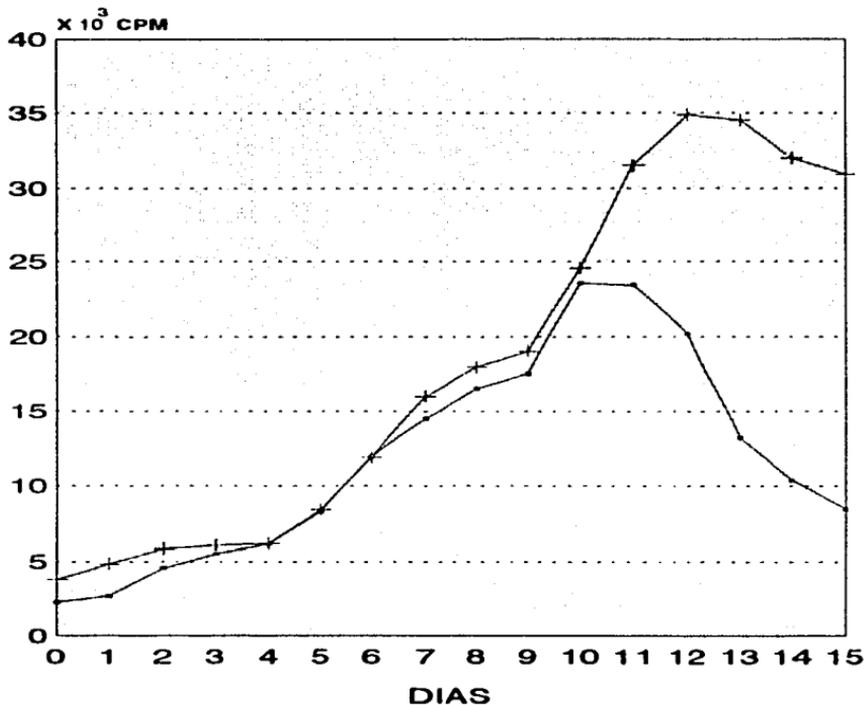
Para evaluar las cinéticas de proliferación, las células de los pacientes 1 y 2 y de los donadores normales se cultivaron en presencia de  $^3\text{H}$ -timidina, observándose que solo los fibroblastos procedentes de los pacientes con fibrosis, continuaron con la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina aún después de diez días de cultivo (Figuras 2 y 3). Asimismo, se determinó



**FIGURA 1.** Fotografías de los explantes de médula ósea del donador normal (A) y del paciente 1 (B), al día diez de cultivo. Fotografías de los fibroblastos del donador normal (C) y del paciente 1 (D), al día once de cultivo.



**FIGURA 2.** Cinética de proliferación de fibroblastos de médula ósea del paciente 1 de LAL con fibrosis y de un donador normal. (+) paciente 1; (□) donador normal. El porcentaje de variación de cada uno de los puntos es menor al 3% de cada valor.



**FIGURA 3.** Cinética de proliferación de fibroblastos de médula ósea del paciente 2 de LAL con fibrosis y un donador normal. (+) paciente 2; (□) donador normal. El porcentaje de variación de cada uno de los puntos es menor al 3% de cada valor.

que la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en los fibroblastos de los pacientes 1 y 2, es significativamente mayor ( $p=3.66 \times 10^{-3}$  y  $p=1.80 \times 10^{-3}$  respectivamente) que la observada en los fibroblastos de donadores normales. Esta alta incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina indica un aumento anormal en la proliferación de los fibroblastos de los pacientes de LAL con fibrosis.

**Cuadro 1. Datos generales de los pacientes de LAL con fibrosis medular.**

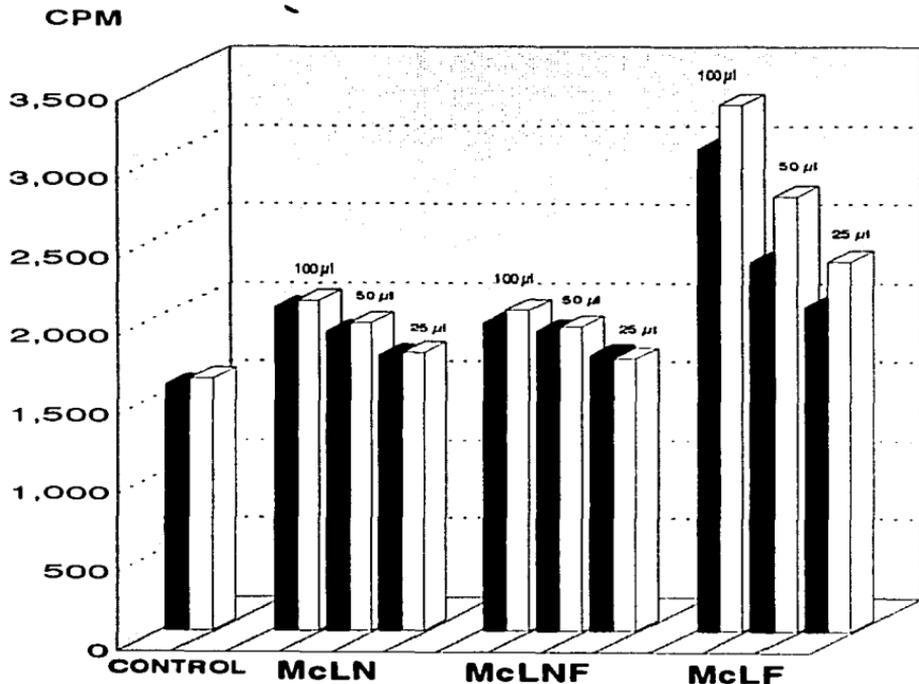
PACIENTE	SEXO/EDAD	No. LEUCOCITOS (cantidad/litro)	% BLASTOS MO	% BLASTOS SP
1	F/17	$4 \times 10^9$	98	59
2	M/34	$5.2 \times 10^3$	38	18
3	F/75	$1.8 \times 10^3$	26	28
4	F/20	$4.4 \times 10^3$	39	15
5	M/19	$11.2 \times 10^3$	48	24
6	M/20	$1.1 \times 10^9$	86	53
7	M/16	$3 \times 10^9$	97	96
8	F/70	$12 \times 10^3$	41	8

Todos los pacientes estudiados fueron del subtipo morfológico L2. F: sexo femenino; M: sexo masculino; MO: médula ósea; SP: sangre periférica.

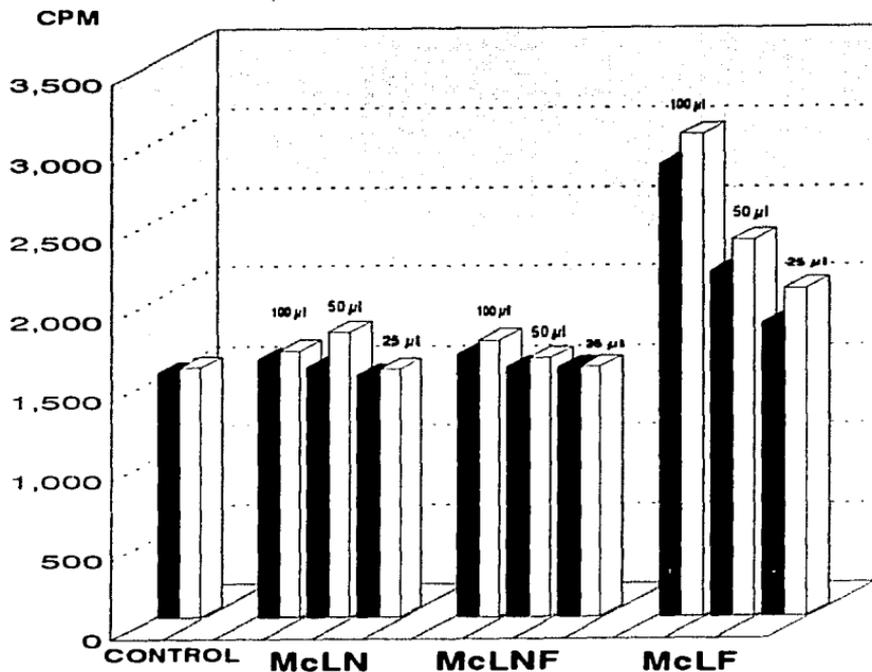
*El medio condicionado de linfoblastos procedentes de pacientes de LAL con fibrosis induce la proliferación de los fibroblastos de los mismos pacientes y de fibroblastos normales.* La proliferación anormal que se observa in vivo en los fibroblastos de la MO de los pacientes de LAL con fibrosis, sugiere la presencia de una actividad estimuladora procedente de las células de leucemia, es decir, de los linfoblastos. Para evaluar esta hipótesis se obtuvo: medio condicionado de linfoblastos de pacientes con fibrosis

(McLF); medio condicionado de linfoblastos de pacientes sin fibrosis (McLNF) y medio condicionado de linfocitos normales (McLN). Estos medios se adicionaron al cultivo tanto de los fibroblastos de pacientes con fibrosis, como de fibroblastos de donadores normales en presencia de  $^3\text{H}$ -timidina. Se incluyó un control en ausencia de medio condicionado. Se observó que la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en los fibroblastos, inducida por el McLF del paciente 1 (Figura 4), es significativamente mayor que la inducida por: 1) el control ( $p = 3.51 \times 10^{-9}$ ); 2) el McLN ( $p = 6.43 \times 10^{-13}$ ) y 3) el McLNF ( $p = 4.84 \times 10^{-12}$ ). Además, se determinó que entre la incorporación inducida por el McLN y el McLNF no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). El aumento en la incorporación inducida por el McLF se observó en ambos tipos de fibroblastos, sin embargo, fue significativamente mayor en los fibroblastos de los pacientes con fibrosis con respecto a los fibroblastos del donador normal, a cualquier concentración de McLF ( $p = 3.57 \times 10^{-7}$  a 100  $\mu\text{l}$ ,  $p = 2.27 \times 10^{-8}$  a 50  $\mu\text{l}$  y  $p = 5.44 \times 10^{-7}$  a 25  $\mu\text{l}$ ). Este aumento fue dosis dependiente, dado que la incorporación inducida con 100  $\mu\text{l}$  de McLF es significativamente mayor que la incorporación obtenida con 50  $\mu\text{l}$  ( $p = 3.18 \times 10^{-8}$ ), y esta última significativamente mayor que la obtenida con 25  $\mu\text{l}$  del mismo medio ( $p = 2.22 \times 10^{-7}$ ). Resultados similares se observaron al analizar los medios condicionados de linfoblastos procedentes de los pacientes 2, 3 y 4.

Los resultados obtenidos con el paciente 2 fueron los siguientes (Figura 5): la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina inducida por el McLF es significativamente mayor que la incorporación inducida por: 1) el control ( $p = 3.13 \times 10^{-7}$ ); 2) el McLN ( $p = 1.77 \times 10^{-13}$ ) y 3) el McLNF ( $p = 1.10 \times 10^{-13}$ ). No hay diferencias significativas entre el control, el McLN y el McLNF ( $p > 0.05$ ). El McLF induce una mayor incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en los



**FIGURA 4.** Efecto del medio condicionado de células linfoides del paciente 1 de LAL con fibrosis, sobre la proliferación de los fibroblastos. Fibroblastos de un donador normal (■); fibroblastos del paciente 1 de LAL y fibrosis (□) Medio condicionado de linfocitos normales (McLN); medio condicionado de linfoblastos de LAL sin fibrosis (McLNF); medio condicionado de linfoblastos del paciente 1 de LAL con fibrosis (McLF); sin medio condicionado (control). El porcentaje de variación de cada una de las barras es menor al 2% de cada valor.

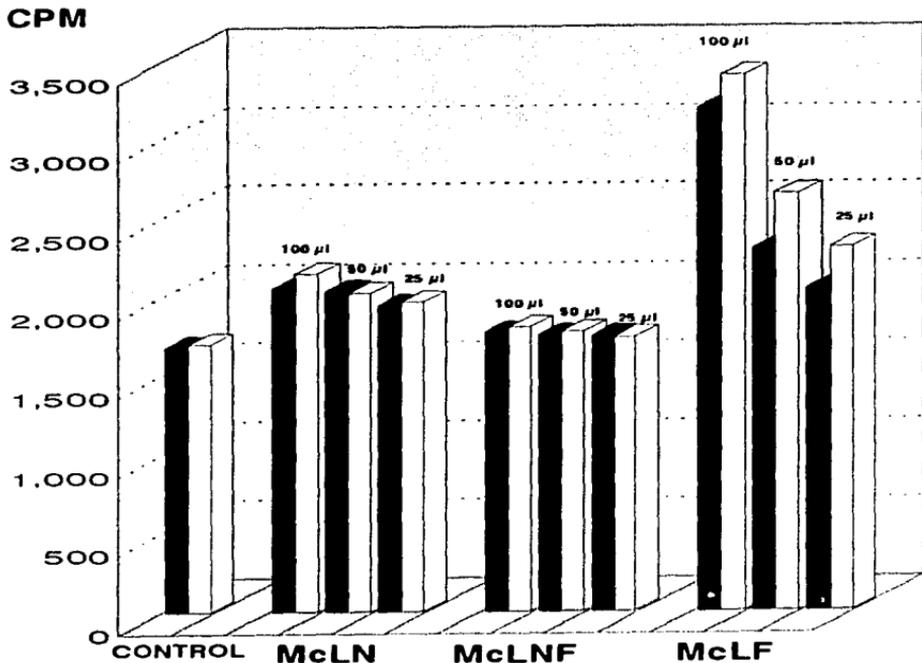


**FIGURA 5. Efecto del medio condicionado de células linfoides del paciente 2 de LAL con fibrosis, sobre la proliferación de los fibroblastos.** Fibroblastos de un donador normal (■), fibroblastos del paciente 2 de LAL y fibrosis (□). Medio condicionado de linfocitos normales (McLN), medio condicionado de linfoblastos de LAL sin fibrosis (McLNF); medio condicionado de linfoblastos del paciente 2 de LAL con fibrosis (McLF); sin medio condicionado (control). El porcentaje de variación de cada una de las barras es menor al 2.4% de cada valor.

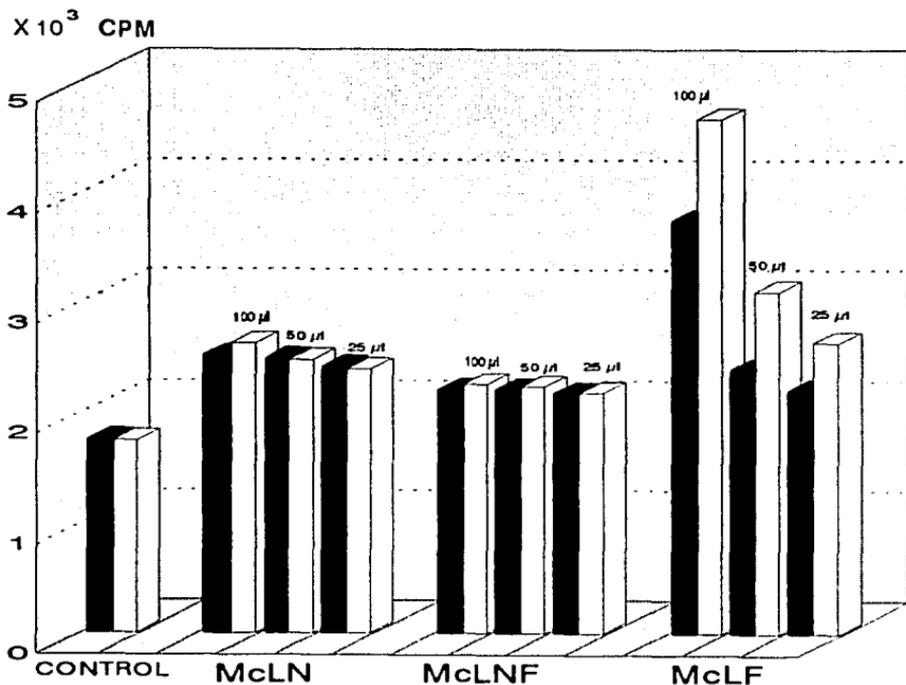
fibroblastos del mismo paciente con respecto a los fibroblastos del donador normal, en cualquiera de las concentraciones utilizadas ( $p=5.12 \times 10^{-6}$  a  $100 \mu\text{l}$ ;  $p=2.64 \times 10^{-6}$  a  $50 \mu\text{l}$ ;  $p=1.14 \times 10^{-6}$  a  $25 \mu\text{l}$ ). La incorporación inducida por el McLF es con  $100 \mu\text{l}>50 \mu\text{l}$  ( $p=1.29 \times 10^{-11}$ ) y con  $50 \mu\text{l}>25 \mu\text{l}$  ( $p=3.47 \times 10^{-6}$ ).

Asimismo, los resultados obtenidos con el paciente 3 fueron los siguientes (Figura 6): la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina inducida por el McLF es significativamente mayor que la inducida por: 1) el control ( $p=3.36 \times 10^{-7}$ ); 2) el McLN ( $p=6.45 \times 10^{-9}$ ) y 3) el McLNF ( $p=7.58 \times 10^{-9}$ ). Hay diferencias significativas en la incorporación inducida entre McLN y McLNF, siendo mayor la inducida por el McLN ( $p<0.05$ ). El McLF induce una mayor incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en los fibroblastos del mismo paciente con respecto a los fibroblastos del donador normal, en cualquiera de las concentraciones utilizadas ( $p=3.25 \times 10^{-6}$  a  $100 \mu\text{l}$ ;  $p=4.89 \times 10^{-8}$  a  $50 \mu\text{l}$ ,  $p=3.68 \times 10^{-7}$  a  $25 \mu\text{l}$ ). La incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina inducida por el McLF es con  $100 \mu\text{l}>50 \mu\text{l}$  ( $p=2.19 \times 10^{-10}$ ) y con  $50 \mu\text{l}>25 \mu\text{l}$  ( $p=3.93 \times 10^{-4}$ ).

Por último, se evaluó el paciente 4 y se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 7): la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina inducida por el McLF es significativamente mayor que la inducida por: 1) el control ( $p=2.37 \times 10^{-4}$ ); 2) el McLN ( $p=9.028 \times 10^{-5}$ ) y 3) el McLNF ( $p=5.20 \times 10^{-5}$ ). No hay diferencias significativas entre la incorporación inducida por el McLN y el McLNF ( $p>0.05$ ). El McLF induce una mayor incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en los fibroblastos del mismo paciente con respecto a los fibroblastos del donador normal, a cualquier concentración de McLF ( $p=1.64 \times 10^{-11}$  a  $100 \mu\text{l}$ ;  $p=1.26 \times 10^{-10}$  a  $50 \mu\text{l}$ ;  $p=2.11 \times 10^{-12}$  a  $25 \mu\text{l}$ ). La incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina inducida por el McLF es con  $100 \mu\text{l}>50 \mu\text{l}$  ( $p=2.73 \times 10^{-7}$ ) y con  $50 \mu\text{l}>25 \mu\text{l}$  ( $p=3.51 \times 10^{-3}$ ).



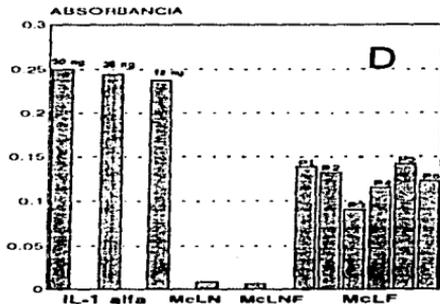
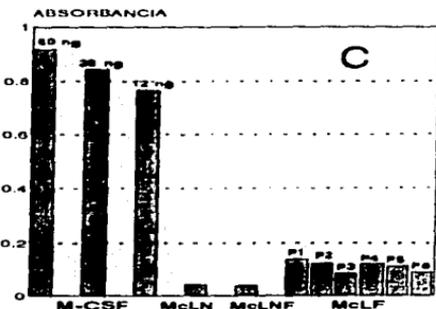
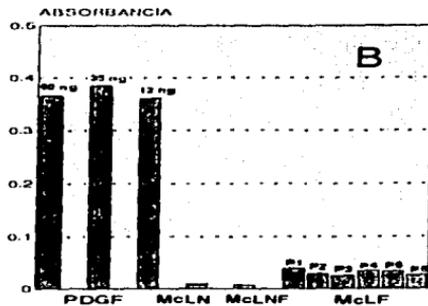
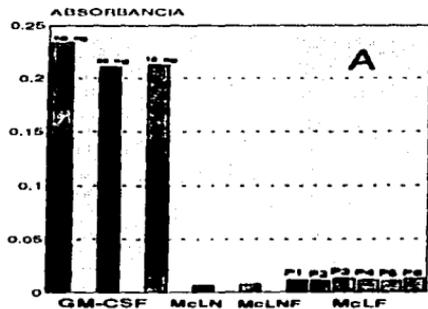
**FIGURA 6.** Efecto del medio condicionado de células linfoides del paciente 3 de LAL con fibrosis, sobre la proliferación de los fibroblastos. Fibroblastos de un donador normal (■), fibroblastos del paciente 3 de LAL y fibrosis (□). Medio condicionado de linfocitos normales (McLN), medio condicionado de linfoblastos de LAL sin fibrosis (McLNF); medio condicionado de linfoblastos del paciente 3 de LAL con fibrosis (McLF); sin medio condicionado (control). El porcentaje de variación de cada una de las barras es menor al 1.7% de cada valor



**FIGURA 7.** Efecto del medio condicionado de células linfoides del paciente 4 de LAL con fibrosis, sobre la proliferación de los fibroblastos. Fibroblastos de un donador normal (■); fibroblastos del paciente 4 de LAL y fibrosis (□). Medio condicionado de linfocitos normales (McLN), medio condicionado de linfoblastos de LAL sin fibrosis (McLNF); medio condicionado de linfoblastos del paciente 4 de LAL con fibrosis (McLF), sin medio condicionado (control) El porcentaje de variación de cada una de las barras es menor al 2.4% de cada valor.

Estos resultados indican que los medios condicionados de las células de leucemia de pacientes con fibrosis, inducen un aumento significativo en la proliferación de los fibroblastos y que este efecto no se observa al utilizar medio condicionado de linfocitos normales o bien medio condicionado de linfoblastos de pacientes sin fibrosis. Además, esta inducción de la proliferación es dosis dependiente y se observa un mayor efecto en los fibroblastos del mismo paciente. Así, los linfoblastos procedentes de pacientes con fibrosis tienen la capacidad de producir factores que estimulan una mayor proliferación de los fibroblastos de MO.

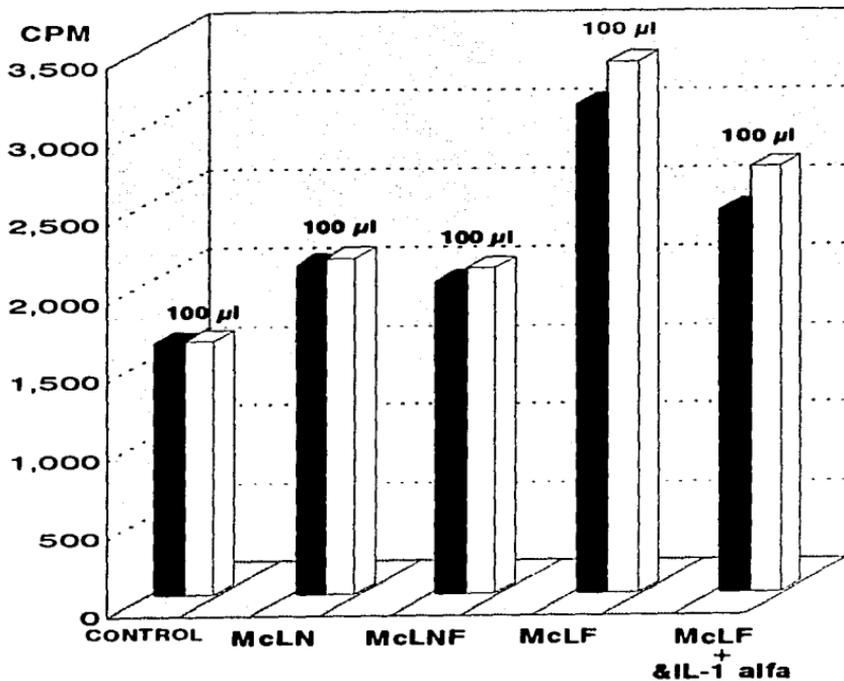
*El medio condicionado de linfoblastos procedentes de pacientes de LAI, con fibrosis contiene una mayor cantidad de IL-1 $\alpha$  en comparación con el medio condicionado de linfoblastos procedentes de pacientes de LAI, sin fibrosis.* Para evaluar la presencia de citocinas responsables de la inducción de la proliferación de los fibroblastos en el medio condicionado de linfoblastos de los pacientes con fibrosis, se determinó mediante ensayos de ELISA la posible existencia de GM-CSF, M-CSF, PDGF e IL-1 $\alpha$ . En la figura 8D se observa que existe una mayor cantidad de IL-1 $\alpha$  en el medio condicionado de linfoblastos de pacientes con fibrosis, en comparación con el medio condicionado de linfoblastos de pacientes sin fibrosis o el medio condicionado de linfocitos normales. En menor proporción, pero presentando todavía una cantidad aumentada con respecto a los controles, se detectó la presencia de los factores M-CSF (Figura 8C) y PDGF (Figura 8B) en el medio condicionado de linfoblastos de los pacientes con fibrosis.



**FIGURA 8. Presencia de citocinas en los medios condicionados de linfoblastos procedentes de pacientes de LAL con fibrosis.** Se incluyeron en el ensayo de ELISA, diferentes concentraciones de las citocinas recombinantes. (A) GM-CSF; (B) PDGF; (C) M-CSF y (D) IL-1 alfa. Medio condicionado de linfocitos normales (McLN); medio condicionado de linfoblastos de LAL sin fibrosis (McLNF); medio condicionado de linfoblastos de pacientes de LAL con fibrosis (McLF). Pacientes con fibrosis (P1 a P6).

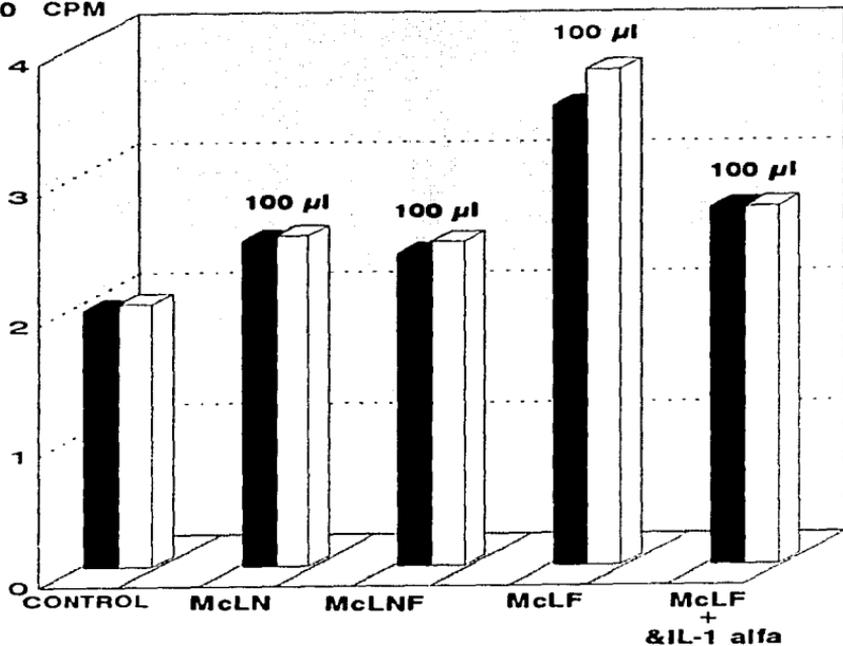
***La inhibición de la IL-1 $\alpha$  produce un bloqueo en la estimulación de la proliferación de los fibroblastos inducida por el medio condicionado de los linfoblastos de pacientes con fibrosis.*** La presencia de una cantidad elevada de la IL-1 $\alpha$  en el medio condicionado de linfoblastos de pacientes con fibrosis, sugiere que podría ser la citocina responsable del incremento de la proliferación observada en los fibroblastos. En consecuencia, se procedió a bloquear la actividad biológica de esta molécula mediante el uso de anticuerpos específicos contra la IL-1 $\alpha$ . La figura 9 muestra que este anticuerpo a una dilución de 1:5 disminuyó de manera significativa ( $p= 1.96 \times 10^{-11}$ ) la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina inducida por 100  $\mu\text{l}$  de MCLF del paciente 1, sobre los fibroblastos del mismo paciente. También se observó una disminución significativa en la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en los fibroblastos del donador normal ( $p= 4.49 \times 10^{-11}$ ). Los porcentajes de disminución de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina fueron de 38 y 45% en los fibroblastos del paciente 1 y del donador normal, respectivamente.

Resultados similares fueron obtenidos con el medio condicionado de linfoblastos procedente del paciente 4 (Figura 10), dado que el anticuerpo a la misma dilución disminuyó significativamente la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina tanto en los fibroblastos del mismo paciente ( $p=1.28 \times 10^{-11}$ ), como en los fibroblastos del donador normal ( $p=1.30 \times 10^{-10}$ ). Los porcentajes de disminución fueron de 59 y 51% en los fibroblastos del paciente 4 y del donador normal, respectivamente. Los resultados anteriores muestran que el anticuerpo dirigido contra la IL-1 $\alpha$  inhibe aproximadamente el 50% de la proliferación de los fibroblastos estimulados con el medio condicionado de linfoblastos de pacientes con fibrosis.



**FIGURA 9.** Inhibición de la actividad estimuladora de la proliferación presente en el medio condicionado de linfoblastos del paciente 1 de LAL con fibrosis mediante anticuerpos dirigidos contra la IL-1 alfa. Fibroblastos de un donador normal (■), fibroblastos del paciente 1 de LAL y fibrosis (□). Medio condicionado de linfocitos normales (McLN); medio condicionado de linfoblastos de LAL sin fibrosis (McLNF); medio condicionado de linfoblastos del paciente 1 de LAL con fibrosis (McLF); sin medio condicionado (control). Anticuerpos dirigidos contra la IL-1 alfa a una dilución de 1:5 (&IL-1 alfa). El porcentaje de variación de cada una de las barras es menor al 1.9% de cada valor.

$\times 10^3$  CPM



**FIGURA 10.** Inhibición de la actividad estimuladora de la proliferación presente en el medio condicionado de linfoblastos del paciente 4 de LAL con fibrosis, mediante anticuerpos dirigidos contra la IL-1 alfa. Fibroblastos de un donador normal (■); fibroblastos del paciente 4 de LAL y fibrosis (□). Medio condicionado de linfocitos normales (McLN), medio condicionado de linfoblastos de LAL sin fibrosis (McLNF), medio condicionado de linfoblastos del paciente 4 de LAL con fibrosis (McLF), sin medio condicionado (control). Anticuerpos dirigidos contra la IL-1 alfa a una dilución de 1:5 (&IL-1 alfa). El porcentaje de variación de cada una de las barras es menor al 1.3% de cada valor.

## DISCUSION

Las citocinas participan en el control del crecimiento de las células, y pueden regular de manera positiva o negativa la proliferación celular e influenciar el proceso de diferenciación (Dexter y Heyworth, 1994). La interacción de dichas citocinas con receptores específicos de la membrana plasmática, desencadena una cascada de señales bioquímicas intracelulares que dan por resultado la activación y/o represión de varios genes que participan en los procesos biológicos mencionados (Samanta, 1995).

Aberraciones genéticas y alteraciones en los mecanismos de transducción de señales, se presentan en una variedad de enfermedades crónicas, incluyendo la leucemia (Hansen, 1995). En este tipo de padecimiento, cualquier célula que se originan en la médula ósea (MO), pueden sufrir una transformación y proliferación clonal y dar lugar a células que no son funcionales para el organismo (Hurwitz, 1995). De particular interés por sus características biológicas, la leucemia aguda linfoblástica (LAL) es un tipo de leucemia que se distingue por un exceso de células inmaduras linfopoyéticas en la MO (Head y Behm, 1995). Algunos pacientes con esta enfermedad presentan fibrosis medular (FMO), el cual es un factor de mal pronóstico (Thiele, 1995; Sahu, 1997). El origen de la fibrosis se desconoce, sin embargo en pacientes con leucemia megacarioblástica asociada a fibrosis, se ha encontrado que la MO sufre una infiltración de megacarioblastos con la capacidad de secretar factores de crecimiento, como el derivado de plaquetas (PDGF), el cual estimula la proliferación de las células estromales (Kimura, 1988; Ozen, 1997). Asimismo, en pacientes con leucemia linfocítica crónica, se ha observado que la interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) producida

por las células de leucemia, favorece el desarrollo de la FMO a través de la proliferación de los fibroblastos de MO (Kimura, 1993).

Con base en estos antecedentes y tomando en cuenta que en algunos casos de LAL se presenta FMO, el presente trabajo se desarrollo con la finalidad de determinar si las células de leucemia de pacientes con LAL, producen citocinas con la capacidad de inducir la proliferación anormal de los fibroblastos de MO, lo cual podría explicar la presencia de este padecimiento.

Los datos indican que los fibroblastos procedentes de pacientes con LAL que cursan con FMO, presentan una proliferación anormal, ya que a diferencia de los fibroblastos de donadores sanos, estas células no exhiben inhibición de la multiplicación, por el contrario proliferan formando varias capas. Este comportamiento puede contribuir al incremento de las células fibroblásticas en la MO de los pacientes con fibrosis. Estos resultados concuerdan con los experimentos de otros investigadores (Kimura, 1988 y 1990), los cuales demuestran que los fibroblastos procedentes de la MO de pacientes con desórdenes mieloproliferativos difieren de los procedentes de individuos sanos, en cuanto a la sensibilidad a factores mitogénicos del suero y a citocinas como el PDGF, lo cual podría representar otra alteración en la enfermedad pero a nivel de células estromales, como se ha observado en leucemia mieloide crónica (Bhatia, 1995).

Determinamos que los linfoblastos de pacientes con fibrosis ejercen un efecto estimulador de la proliferación de los fibroblastos (Figuras 4-7) y que esta actividad es modulada principalmente por factores como el M-CSF, PDGF e IL-1 $\alpha$  (Figura 8). Asimismo, nuestros datos indican que esta última citocina es el principal factor responsable

de la estimulación, ya que en el ensayo de bloqueo de su actividad biológica con anticuerpos específicos, se obtuvo una disminución significativa en la capacidad de la proliferación (Figuras 9 y 10). Sin embargo, debido a que la actividad proliferativa no fue neutralizada completamente por el anticuerpo, podemos suponer que los otros factores mitogénicos detectados como el M-CSF y el PDGF, pueden contribuir a la proliferación de los fibroblastos. Hallazgos muy similares han sido reportados para pacientes con leucemia linfocítica crónica (Kimura, 1993).

Los anteriores resultados pueden ser interpretados como una evidencia de que en LAL con FMO, uno de los mecanismos que participan en la aparición de la fibrosis es la secreción de IL-1 $\alpha$  por las mismas células de leucemia, la cual induce la proliferación descontrolada de los fibroblastos de MO. Debido a que se han encontrado en distintos tipos de leucemia asociada con fibrosis, la participación de diferentes citocinas en su patogénesis (Kimura, 1993; Reilly, 1994; Kimura 1995; Martyre, 1994, Rameshwar, 1996), se podría sugerir que la fibrosis es una alteración cuyo desarrollo depende del tipo de leucemia y de las citocinas que estas mismas células son capaces de secretar, en cantidades mayores a lo que hacen las células normales.

Por otra parte, se sabe que las células malignas presentan ciertas características como son: ausencia de inhibición de la proliferación por contacto, independencia de factores séricos, capacidad de crecimiento en medios semisólidos, capacidad de formar tumores en ratones atímicos, y la presencia de alteraciones genéticas (oncogenes y genes supresores de tumores). En este estudio, hemos observado que la proliferación in vitro de los fibroblastos de pacientes de LAL con FMO, es anormal en comparación con fibroblastos provenientes de

donadores sanos, dado que han perdido la inhibición por contacto y continúan la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina, aún después de varios días de cultivo. Esto parece indicar, que por si solos los fibroblastos derivados de MO con fibrosis, presentan la capacidad de proliferar tal y como lo realizan las células transformadas, lo cual por una parte cuestiona el papel de los linfoblastos como única vía en la inducción a la proliferación de los fibroblastos, llevando a establecer la posibilidad de que estas células se encuentren transformadas.

De esta forma, el posible modelo para el desarrollo de esta enfermedad, en la cual participan de manera activa las células de leucemia es el siguiente: el fibroblasto responde a factores secretados por las células de leucemia y a la vez presenta anomalías en su capacidad de proliferación, lo que le permite ir desplazando progresivamente a los demás elementos celulares de la MO. Sin embargo, es necesario evaluar los demás parámetros mencionados, lo cual nos permitirá saber si estas células están transformadas, o bien, si se encuentran en un estadio intermedio hacia la transformación.

En la actualidad, todavía no se establece con seguridad la patogénesis de la fibrosis, aunque al parecer es un padecimiento cuyo desarrollo es característico del tipo de leucemia donde se presenta, de ahí que en LAL, estemos proponiendo la participación tanto de las células de leucemia como la de los mismos fibroblastos, en la progresión de esta enfermedad.

Por lo pronto, con el presente estudio se han aportado conocimientos sobre algunos de los mecanismos involucrados en la promoción de la fibrosis de la MO, en pacientes con leucemia aguda linfoblástica. Estos estudios podrían dar la pauta para que en un futuro, conociendo la participación de la IL-1 $\alpha$ , se implemente el uso de inhibidores de esta citocina en la terapia de estos pacientes, dado que su bloqueo permitiría disminuir la masa celular de

**fibroblastos y a su vez el posible efecto que pudieran ejercer factores secretados por estas células sobre la proliferación de los linfoblastos leucémicos; o bien, adicionar al esquema quimioterapéutico fármacos dirigidos contra los fibroblastos, ya que estas células podrían estar transformadas y requerir drogas diferentes a las utilizadas para la leucemia, ello con el objeto de eliminarlas y mejorar la terapéutica y el pronóstico de estos pacientes.**

## BIBLIOGRAFIA

- Abkowitz, J., Catlin, S. and Gutter, P. 1996. Evidence that hematopoiesis may be a stochastic process in vivo. *Nat Med* 2:190.
- Allen, T and Dexter, M. 1990. Marrow biology and stem cells Chap: 1 in Dexter, M., Garland, M. and Testa, N. *Colony-Stimulating Factors. Molecular and Cellular Biology.* Marcel Dekker, New York, USA. pp 1-38.
- Apaja-Sarkkinen, M., Autio-Harminen, H., Alavaikko, M., Risteli, J. and Risteli, L. 1986. Immunohistochemical study of basement membrane proteins and type III procollagen in myelofibrosis. *Br J Haematol* 69:483.
- Arni, K., Lee, F. and Miyajima, A. 1992. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann Rev Biochem* 59:783.
- Arend, W. and Malyak, M. 1992. The biologic role of naturally-occurring cytokine inhibitors *Br J Rheumatol* 12:49.
- Bagby, G. 1989. Interleukin-1 and hematopoiesis. *Blood Reviews* 3:152.
- Baker, R and Manorharan, A. 1988. Platelet function in myeloproliferative disorders: characterization and sequential studies show multiple platelet abnormalities, and change with time. *Eur J Haematology* 40:267.
- Barulli, S., Rupoli, S., Cinciripini, A., Scortechini, A., Cantori, I. and Leoni, P. 1995. Idiopathic myelofibrosis. Main pathogenetic, prognostic and therapeutic aspects. *Recenti Prog Med* 86:312.
- Becker, R. and DeBruyn, P. 1976. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation, a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat* 145:183.

**Bhatia, R., McGlave, P., Dewald, G., Blazar, B. and Verfaillie, C. 1995. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. Blood. 85:3636.**

**Bloomfield, C. 1983. Chromosomal abnormalities and their clinical significance in acute lymphoblastic leukemia. Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Cancer Res 43:868.**

**Boldt, D., Kopecky, K., Head, D., Gehly, G., Radich, J. and Appelbaum, F. 1994. Expression of myeloid antigens by blast cells in acute lymphoblastic leukemia of adults. The Southwest Oncology Group experience. Leukemia. 8:2118.**

**Bradley, T. and Metcalf, D. 1966. The growth of bone-marrow cells in vitro. Aust J Exp Biol Med Sci 44:553.**

**Bradley, T., Williams, N., Kriegler, A., Fawcett, J. and Hodgson, G. 1989. In vivo effects of interleukin 1 alpha on regenerating mouse bone marrow myeloid colony forming cells after treatment with 5-fluorouracil. Leukemia 3:893.**

**Brow, B. 1976. Blood cells Chap 5 in: hematology: principles and procedure. Lea and Febiger. Philadelphia, USA. pp 29-70.**

**Burkhardt, R., Bartl, R., Beil, E., Demmler, K., Hoffman, E and Kronseder, A. 1974. Myelofibrosis-osteomyeloclerosis syndrome: review of literature in histomorphology. Advances in the Biosciences, Dahlem Workshop on myelofibrosis-Osteomyeloclerosis syndrome. Berlin. pp 54.**

**Bussolino, F., Bocchietto, E., Silvagno, F., Soldi, R., Arese, M. and Mantovani, A. 1994. Actions of molecules which regulate hemopoiesis on endothelial cells: memoirs of common ancestors?. Leukemia 190:834.**

Castro-Malaspina, H., Rabellino, E., Yen, A., Nachman, R. and Moore, M. 1981. Human megacaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblast. *Blood* 57:781.

Castro-Malaspina, H., Gay, R.E., and Thanwar, S.L. 1982. Characteristics of bone marrow fibroblast colony forming cells and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 59:1046.

Catovsky, D. 1991. *The leukemic cell*. Churchill Livingstone, London, UK. pp 392.

Chabot, B., Stephenson, D., Chapman, V., Besmer, P. and Bernstein, A. 1988. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335:88.

Chamberlain, J., Leblond, P and Weed R. 1975. Reduction of adventitial cell cover: an early direct effect of erythropoiesis on bone marrow ultrastructure. *Blood Cells* 1:665.

Christensen, R. 1989. Hematopoiesis in the fetus and neonate. *Pediatric Research*. 26:531.

Civin, C., Almeida-Porada, G., Lee, M., Olweus, J., Terstappen, L. and Zanjani, E. 1996. Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 88:4102.

Clark, B. and Keating, A. 1995. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci* 770:70.

Clark, S. and Kamen, R. 1987. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 238:1374.

Cluitmans, F., Esendam, B., Landegent, J., Willemze, R. and Falkenburg, J. 1995. Constitutive in vivo cytokine and hematopoietic growth factor gene expression in the bone marrow and peripheral blood of healthy individuals. *Blood*. 85:2038.

Cocconi, F., Lees, J. and Dinarello, C. 1988. Occurrence of interleukin 1 in cerebrospinal fluid of the conscious cat. *Brain Res* 446:245.

Crossier, P., Garnick, M. and Clark, S. 1992. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor. In Aggarwal, B., Gutterman, J. *Human Cytokines*. Blackwell Scientific Publications, USA. pp 232-252.

Das, S., Stanley, E., Guilbert, L. and Forman, L. 1981. Human colony stimulating factor (CSF-1) radioimmunoassay: resolution of three subclasses of human colony stimulating factors. *Blood* 58:630.

Dayr, J., de Rochemonteix, B., Burrus, B., Demczuk, S. and Dinarello, C. 1986. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest* 77:645.

Delikat, S., Galvani, D. and Zuzel, M. 1995. The metabolic effects of interleukin 1 beta on human marrow adipocytes. *Cytokine* 7:338.

Deuel, T., Huang, J., Huang, S., Stroobant, P. and Waterfield, M. 1983. Expression of a platelet-derived growth factor-like protein in simian sarcoma virus transformed cells. *Science* 221:1348.

Dexter, T. and Moore, M. 1977. In vitro duplication and "cure" of hemopoietic defects in genetically anaemic mice. *Nature* 269:412.

Dexter, T. and Heyworth, C. 1994. Growth factors and the molecular control of haematopoiesis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 13:53.

Dinarello, C., Ikejima, T., Warner, S., Orencole, S., Lonnemann, G., Cannon, J. and Libby, P. 1987. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cell in vitro. *J Immunol* 139:1902.

- Dinarelo, C. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77:1627.
- Dinarelo, C. 1994a. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 5:117.
- Dinarelo, C. 1994b. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 8:1314.
- Donnenberg, A., Margolick, J. and Donnenberg, V. 1995. Lymphopoiesis, apoptosis and immune amnesia. *Ann N Y Acad Sci* 770:213.
- Dorshkind, K. 1990. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Ann Rev Immunol* 8:111.
- Dreazen, O. 1988. Molecular Biology of chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 25:35.
- Drexler, H., Borkhardt, A. and Janssen, J. 1995. Detection of chromosomal translocations in leukemia-lymphoma cells by polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma* 19:359.
- Elfenbein, G., Janssen, W. and Perkins, J. 1995. Relative contributions of marrow microenvironment, growth factors, and stem cells to hematopoiesis in vivo in man. Review of results from autologous stem cell transplant trials and laboratory studies at the Moffitt Cancer Center. *Ann N Y Acad Sci* 770:315.
- Endres, S., Cannon, J. and Ghorbani, R. 1989. In vitro production IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor and IL-2 in a large cohort of human subjects: distribution, effect of cyclooxygenase inhibition and evidence of independent gene regulation. *J Immunol* 27:57.
- Erbe, D., Collins, J., Shen, L., Graziano, R.F. and Fanger, M. 1990. The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Molecular Immunology* 27:57.

- Erslev, A. and Gabuzda, T. 1985. Pathophysiology of blood. W.B. Saunders Company. Philadelphia. USA. pp. 189.
- Fialkow, P. 1987. Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remissions in acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 317:468.
- Fibbe, W. and Falkenburg, J. 1990. Regulation of hematopoiesis by interleukin-1. *Biotherapy* 2:325.
- Fisher, H., Frosch, S. and Reske, K. 1988. GM-CSF activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J Immunol* 141:3882.
- Fleischman, R., Simpson, F., Gallardo, T., Jin, X. and Perkins, S. 1995. Isolation of endothelial-like stromal cells that express Kit ligand and support in vitro hematopoiesis. *Exp Hematol* 23:1407.
- Florensa, L. y Woessner, S. 1994. Hematopoyesis in: Sansabafren, D. *Hematologia Clinica*. Mosby/Doyma. Barcelona. pp 1-9.
- Garmick, M. y Stoudemire, J. 1990. Preclinical and clinical evaluation of recombinant human macrophage colony-stimulating factor (rhM-CSF). *Int J Cell Cloning* 8:356.
- Gay, S., Gay, R. and Prchal, J. 1984. Immunohistological studies of bone marrow collagen. in: Berk, P., Castro-Malaspina, H. and Wasserman, L. *Myelofibrosis and the biology of connective Tissue*. Alan R. Liss New York. pp 291-306.
- Ghezzi, P., Saccardo, B. and Villa, P. 1986. Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin. *Infect Immun* 54:837.

Gordon, M., Riley, G., Watt, S. and Greaves, M. 1987. Compartmentalization of a hematopoietic growth factor (GM-CSF) by glucosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 326:403.

Greaves, M. and Chan, L. 1986a. Is spontaneous mutation the major "cause" of childhood acute lymphoblastic Leukaemia? *Br J Haematol* 64:1.

Greaves, M. 1986b. Differentiation-linked gene rearrangement and expression in acute lymphoblastic leukemia. *Clin Haematol* 15:621.

Greaves, M. 1988. Lymphocytes Chapt 9 in: *Atlas of blood Cells: Function and Pathology*, vol 1, Zucker- Franklin, D. Ermes, Milan, pp 230-245.

Griffin, J. and Lowenberg, B. 1986. Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 68:1185.

Grosset, C., Jazwiec, B., Taupin, J., Liu, H., Richard, S., Mahon, F., Reiffers, J., Moreau, J. and Ripoche, J. 1995. In vitro biosynthesis of leukemia inhibitory factor/human interleukin for DA cells by human endothelial cells differential regulation by interleukin-1 alpha and glucocorticoides. *Blood* 86:3763.

Gutierrez, M. 1995. *Manual de Leucemias*. Hospital General de México. Servicio de Hematología. pp. 17

Han, X., Chung, S. and Wong, P. 1995. Identification of a unique membrane-bound molecule on a hemopoietic stem cell line and on multipotent progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11014.

Hansen, F. 1995. Hemopoietic growth and inhibitory factors in treatment of malignances. *Acta Oncol* 34:453.

- Hara, H. and Ogawa, M. 1978. Murine hemopoietic colonies in culture containing normoblasts, macrophages and megakaryocytes. *Am J Hematol* 4:23.
- Haynesworth, S., Baber, M. and Caplan, A. 1996. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexametasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol.* 166:585.
- Head, D. and Behm, F. 1995. Acute lymphoblastic leukemia and the lymphoblastic lymphomas of childhood. *Sem Diag Pathol* 12:325.
- Heath, K., Smith, G., Hsu, W. and Rathjen, D. 1990. Growth and differentiation factors of pluripotential stem cells. *J Cell Sci* 13 (Suppl 13):75-85.
- Hermann, F., Oster, W., Meuer, S., Klein, K., Lindemann, A. and Mertelsmann, R. 1988. Interleukin-1 stimulates T lymphocytes to produce GM-CSF. *J Clin Invest* 81:1415.
- Hill, A., Naama, H., Calvano, S. and Daly, J. 1995. The effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myeloid cells and its clinical applications. *J Leukoc Biol* 58:634.
- Hirsch, E., Iglesias, A., Potocnick, A., Hartmann, U. and Fassler, R. 1996. Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta 1 integrins. *Nature* 380:171.
- Hodgson, G. and Bradley, T. 1980. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: Evidences for a pre-CFU-S cell. *Nature* 28:381.
- Hurley, R., McCarthy, J. and Verfaillie, C. 1995. Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest.* 96:511.

Hurwitz, C., Mounce, K. and Grier, H. 1995. Treatment of patients with acute myelogenous leukemia: review of clinical trials of the past decade. *J Pediatr Hematol Oncol* 17:185.

Huyhn, A., Dommergues, M., Izac, B., Croisille, L., Katz, A., Vainchenker, W. and Coulombel, L. 1995. Characterization of hematopoietic progenitors from human yolk sacs and embryos. *Blood* 86:4474.

Jacobson, R., Salo, A. and Fialkow, P. 1978. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 51:189.

Jandl, J. 1991. *Blood: Pathophysiology*. Blackwell Scientific Publications, Inc. Boston, USA. pp. 280.

Jasmin, C. 1988. Leukemic stem cells and the curability of leukemias. *Leuk Res* 12:703

Johnson, G. and Metcalf, D. 1977. Pure and mixed erythroid colony formation *in vitro* stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 74:3879.

Johnson, G. and Metcalf, D. 1980. Detection of a new type of mouse eosinophil colony by Luxol-fast blue staining. *Exp Hematol* 8:549.

Johnson, P. and Yin, J. 1994. Prognostic factors in elderly patients with acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma*. 16:51.

Johnston, J., Dalal, B., Israels, S., Oh, S., McMillan, E., Begleiter, A., Michaud, G., Israels, L., Greenberg, A. 1995. Deposition of transforming growth factor-beta in the marrow in myelofibrosis, and the intracellular localization and secretion of TGF-beta by leukemic cells. *Am J Clin Pathol* 103:574.

- Kemeny, D. 1991. A practical guide to ELISA. Pergamon Press, London, Great Britain. pp. 150.
- Kimura, A., Katoh, O. and Kuramoto, A. 1988. Effect of platelet derived growth factor, epidermal growth factor and transforming growth factor- $\beta$  on the growth of human marrow fibroblast. *Br. J. Haematology* 69:9.
- Kimura, A., Katoh, O. and Kuramoto, A. 1989. Transforming growth factor- $\beta$  regulates growth as well as collagen and fibronectin synthesis of human marrow fibroblast. *Br J Haematol* 72:486.
- Kimura, A., Katoh, O., Hyodo, H., Kusumi, S. and Kuramoto, A. 1990. Fibroblast colony-forming cells with high sensitivity to serum mitogen(s) exist in bone marrow of patients with chronic myelocytic leukemia. *Eur J Haematol* 44:291.
- Kimura, A., Hyodo, H., Nakata, Y and Kuramoto, A. 1993. Chronic lymphocytic leukemia associated with bone marrow fibrosis: possible role of interleukin 1 in the pathogenesis. *Amer. J. Hematology* 43:47.
- Kimura, A., Katoh, O., Hyodo, H., Kuramoto, A. and Satow, Y. 1995. Platelet derived growth factor expression, myelofibrosis and chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 18:237.
- Kiyohiko, H., Tetsuya, O., Masaya, U., Hironori, T., Tohru, I., Minoru, Y., Nobuyuki, K., Ken, S., Ken-ichi, H. and Yasusada, M. 1996. Tretinoin induces bone marrow collagenous fibrosis in acute promyelocytic leukaemia: new adverse, but reversible effect. *Bri J Haematol*, 93:646.

Kohase, M., May, L., Tamm, I., Vilcek, J. and Sehgal, P. 1987. Acytokine network in human diploid fibroblast: interactions of  $\beta$  interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor and interleukin 1. *Mol Cell Biol* 7:273.

Kovacs, E., Oppenheim, J., Carter, D. and Young, H. 1987. Enhanced interleukin-1 production by human monocyte cell lines following treatment with 5-azacytidine. *J Leukocyte Biol.* 41:40.

Krane, S., Conca, W., Stephenson, M., Amento, E. and Goldrin, M. 1990. Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 580:340.

Kurtzberg, J. 1989. CD7+, CD4-, CD8- acute leukemia: a syndrome of malignant pluripotent lymphoematopoietic cells. *Blood* 73:381.

Kurzrock, R. 1988. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias *N Engl J Med* 319:990.

Lacout, C., Dubart, A., Vainchenker, W. and Dumenil, D. 1996. Pluripotent stem cells constitutively expressing a normal erythropoietin receptor give rise to normal hematopoiesis in lethally irradiated recipient mice. *Exp Hematol* 24:18.

LeBien, T. and McCormack, R. 1989. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD-10)-emancipation from a functional enigma. *Blood* 73:625.

Libby, P., Warner, S. and Friedman, G. 1988. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest* 81:487.

Lilly, M., Vo, K., Le, T. and Takahashi, G. 1996. Bryostatin 1 acts synergistically with interleukin-1 alpha to induce secretion of G-CSF and other cytokines from marrow stromal cells. *Exp Hematol* 24:613.

March, C., Mosley, B., Larsen, A., Cerreti, D., Braedt, G., Price., V., Gillis, S., Henney, C., Kroheim, S., Grabstein, K., Conlon, P., Hopp, T. and Cosman, D. 1985. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315:641.

Marsh, J., Chang, J., Testa, N., Hows, M. and Dexter, M. 1990. The hamatopoietic defect in aplastic anemia assessed by long-term marrow culture. *Blood* 76:1748.

Martyre, N., Romquin, M., LeBousse-Kerdiles, S., Chevillard, B., Dupriez, B., Demory, J. and Bauters, F. 1994. Transforming growth factor- $\beta$  and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *B J Haematol* 88:9.

Mauer, A. 1989. Acute Lymphocytic Leukemia Chap: 113 in: William J W, Beutler, E., Erisev, A. and Linchtman M. Hematology 4th Ed. Mc Graw-Hill, New York. pp 996-997.

McCarthy, D. 1985. Fibrosis of the bone marrow: content and causes. *Br. J. Haematology* 59:1.

Meager, A. 1991. Cytokines. Prentice Hall, New Jersey, USA. pp 276.

Metcalf, D. and Burgess, A. 1982. Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. *J Cell Physiol* 111:275.

Miranda, E., Valles, Y., Hernández, L., Rangel, L., Castrejon, A., Collazo-Jaloma, J., Gutierrez, M., Gonzalez, R., y Gariglio, P. 1991. Estudio de la proteína myc y de proteínas antigénicamente relacionadas a myc en leucemia linfoblástica aguda. *Rev Inv Clin* 43:139.

Muegge, K., Vila, M., Gusella, G., Musso, T., Herrlich, P., Stein, B. and Durum, S. 1993. IL-1 induction of the c-jun promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7054.

Muller-Sieburg, C. and Deryugina, E. 1995. The stromal cells guide to the stem cell universe. *Stem Cells* Dayt 13:477.

Nakamura, T., Okuda, S., Miller, D., Ruoslahti, E. and Border, W. 1990. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) regulates production of extracellular matrix (ECM) components by glomerular epithelial cells. *Kidney International* 37:221.

Novitzky, N. and Mohamed, R. 1995a. Alterations in both the hematopoietic microenvironment and the progenitor cell population follow the recovery from myeloablative therapy and bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 23:1661

Novitzky, N. and Jacobs, P. 1995b. Immunosuppressive therapy in bone marrow aplasia: the stroma functions normally to support hematopoiesis. *Exp Hematol* 23:1472.

Overall, C., Wrana, J. and Sodek, J. 1989. Independent regulation of collagenase, 72 kDa-matrilysin, and metalloendoproteinase inhibitor (TIMP) expression in human fibroblast by transforming growth factor- $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry* 264:1860.

Ozen, S., Ferhanoglu, B., Senocak, M. and Tuzuner, N. 1997. Idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia): clinicopathological analysis of 32 patients. *Leuk Res* 21:2.

Pearson, C., Pearson, D., Shibahara, S., Hofsteenge, J and Chiquet, E.. 1988. Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF- $\beta$ . *EMBO J* 7:2977.

Peterson, V., Hansbrough, J. and Buerk, C. 1992. Regulation of granulopoiesis following severe thermal injury. *J Trauma* 23:19.

Pluznik, D. and Sachs, L. 1965. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66:319.

Pluznik, D. and Sachs, L. 1966. The induction of clones of normal "mast" cells by a substance from conditioned medium. *Exp Cell Res* 43:553.

Rameshwar, P., Chang, V. and Gascon, P. 1996. Implication of CD44 in adhesion-mediated overproduction of TGF-beta and IL-1 in monocytes from patients with bone marrow fibrosis. *Br J Haematol* 93:22.

Registro Nacional de Cáncer. 1993. Ed. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología, México. pp 16.

Reilly, J., Nash, J., Mackie, M. and McVerry, B. 1985a. Immuno-enzymatic detection of fibronectin in normal and pathological haematopoietic tissue. *British Journal of Haematology* 59:497.

Reilly, J., Nash, J., Mackie, M. and McVerry, B. 1985b. Endothelial cell proliferation in myelofibrosis. *Br J Haematol* 60:625.

Reilly, J. and Nash, J. 1988. Vitronectin (serum spreading factor): its localisation in normal and fibrotic tissue. *Journal of Clinical Pathology* 59:1269.

Reilly, J. 1992. Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: role of growth factors. *Journal of clinical Pathology* 45:461.

Reilly, J. 1994. Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: present status and future directions. *Br J Haematol* 88:1-8.

Reilly, J., Brindley, L., Kay, M., Fielding, S., Kennedy, A., Dolan, G. and Smith, A. 1995. Bone marrow and serum connective tissue polypeptides in idiopathic myelofibrosis. *Clin Lab Haematol* 17:35.

Reissenweber, N., Gualco, G., Panuncio, A. and Diaz, G. 1995. Quantitative evaluation of juxtatrabeular fibrosis in myelodysplastic syndromes. *Sangre* 40:479.

Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T., Bloomfield, F. and Dexter, T. 1988. Heparan sulphate bound growth factors: A mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* 332:376.

Roberts, A. and Sporn, M. 1990. The transforming growth factor-beta. In: Sporn, M. and Roberts, A. *Peptide Growth Factors and their Receptors*. Springer, New York, USA. pp 112-125.

Romano, M., Viero, P., Cortellazzo, S., Barbui, T., Donati, M and Poggi, A. 1990. Platelet-derived mitogenic activity and bone marrow fibrosis in myeloproliferative disorders. *Haemostasis* 20:162.

Ross, R., Raines, E. and Bowen-Pope, D. 1986. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 46:155.

Roya, S., Feldmann, M. and Hawrylowicz. 1992. Up regulation of HLA class II, but not intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or Interleukin-3 (IL-3) in synergy with dexametasone. *Eur Cytokine Netw* 3:373.

Rubnitz, J., Behm, F. and Downing, J. 1996. 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* 10:74.

Ruoslahti, E. and Yamaguchi, Y. 1991. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64:867.

Russel, E. 1979. Hereditary anemias of the mouse: A review for geneticists. *Adv Gen* 20:357.

- Sacchi, S., Curci, G., Piccinini, L., Messeroti, A., Cucci, F., Bursi, R., Zaniol, P. and Torrelli, V. 1986. Platelet alpha- granule release in chronic myeloproliferative disorders with thrombocytosis. *Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 46:163.
- Sahu, S., Shah, S., Srivastava, A., Dennison, D. and Chandy, M. 1997. Pediatric hyperfibrotic myelodysplasia: an unusual clinicopathologic entity. *Pediatr Hematol Oncol* 14:2.
- Samanta, A., Qian, X. and Greene, M. 1995. Unexpected transcriptional signals in normal and mitotically defective cells mediated through cytokine and growth factor receptor. *DNA Cell Biol* 14:921.
- Sandberg, A. and Chen, Z. 1994. Cancer cytogenetics and molecular genetics: detection and therapeutic strategy. *In Vivo*. 8:807.
- Schmidt, U., Ruwe, M. and Leder, L. 1995. Multiple myeloma with bone marrow biopsy features simulating concomitant chronic idiopathic myelofibrosis. *Nouv Rev Fr Hematol* 37:159.
- Schrader, J. 1985. Bone marrow differentiation *in vitro*. *Crit Rev Immunol* 4:197.
- Sherr, C. and Stanley, E. 1990. Colony Stimulating Factor 1. In: Habenicht, A. Growth factors, differentiation factors and cytokines. Springer-Verlag, Berlin, pp 667-678.
- Sievers, E. and Loken, M. 1995. Detection of minimal residual disease in acute myelogenous leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 17:123.
- Sims, J., Gayle, M., Slack, J., Alderson, M., Bird, T., Giri, J., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K., Grabstein, K. and Dower, S. 1993. Interleukin-1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:6155.

Soini, Y., Kamel, D., Apaja-Sarkkinen, M., Virtanen, I., and Lehto, V-P. 1993. Tenascin immunoreactivity in normal and pathological bone marrow. *J Clin Pathol* 46:218.

Soll, E., Massumoto, C., Clift, R., Buckner, C., Appelbaum, F., Storb, R., Sale, G., Hackman, R. and Martin, P. 1995. Relevance of marrow fibrosis in bone marrow transplantation: a retrospective analysis of engraftment. *Blood* 86:4667.

Stanley, E. 1979. Colony-stimulating factor (CSF) radioimmunoassay: detection of a CSF subclass stimulating macrophage production. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 76:2969.

Stark, B., Resnitzky, P., Jeison, M., Luria, D., Blau, O., Avigad, S., Shaft, D., Kodman, Y., Gobuzov, R. and Ash, S. 1995. A distinct subtype of M4/M5 acute myeloblastic leukemia (AML) associated with t(8:16)(p11:p13), in a patient with the variant t(8:19)(p11;q13), case report and review of the literature. *Leuk Res* 19:367.

Tewari, A., Buhles, W. and Starnes, H. 1990. Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts. *Lancet* 336:712.

Thiele, J., Braeckel, C., Wagner, S., Falini, B., Dienemann, D., Stein, H. and Fisher, R. 1991a. Macrophages in normal human bone marrow and in chronic myeloproliferative disorders: an immunohistochemical and morphometric study by a new monoclonal antibody (PG-M1) on trephine biopsies. *Pathol Anat and Histopathol* 421:33.

Thiele, J., Kuemmel, T., Sander, C. and Fisher, R. 1991b. Ultrastructure of the bone marrow tissue in so-called primary (idiopathic) myelofibrosis-osteomyelosclerosis (agnogenic myeloid metaplasia). I. Abnormalities of megacaryopoiesis and thrombocytes. *J Submicro Cytol and Pathol* 23:93.

Thiele, J., Kvasnicka, H., Niederle, N., Zirbes, T., Schmidt, M., Damasch, J., Meuter, B., Leder, L., Kloke, O. and Diehl, V. 1995. The impact of interferon versus busulfan therapy

on the reticulin stain-measured fibrosis in CML- a comparative morphometric study on sequential trephine biopsies. *Ann Hematol* 70:121.

Tusell, L., Caballin, M., Coll, M., Ortega, J. and Egozcue, J. 1995. Isochromosome 14q in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 80:78.

Tzeng, D., Deuel, T., Huang, J. and Bachner, R. 1985. Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocyte activation. *Blood* 66:179.

Varga, J., Rosenbloom, J. and Jimenez, S. 1987. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal and human dermal fibroblasts. *Biochem J* 247:597.

Vose, J. and Armitage, J. 1995. Clinical application of hematopoietic growth factors *J Clin Oncol.* 13:1023.

Webb, A., Collins, K., Auron, P., Eddy, R., Nakai, H., Byers, M., Haley, L., Henry, W. and Shows, T. 1986. Interleukin-1 gene (IL-1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res* 5:77.

Weinstein, R., Riordan, M., Wene, K., Kreezko, S., Zhou, M. and Dainiak, N. 1989. Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation. *Blood* 73:111.

Weiss, L. 1976. Hematopoietic microenvironment of the bone marrow: An ultrastructural study of the stroma rats. *Anat Rec* 186:161.

Weiss, L. 1977. Leucocytes. In *Hematology*. Lippincott. New York. Chap 10, pp 260-288.

Weiss, L. 1981. Haemopoiesis in mammalian bone marrow. In *microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation*, Ciba Foundation Symposium 84, Porter R and Whelan J. Pitman Medical, London, pp 67-72.

Westen, H. and Bainton, D. 1979. Association of alkaline-phosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocyte precursors. *J Exp Med* 50:919.

Wight, T., Kisella, M., Keating, A. and Singer, J. 1986. Proteoglycans in human long-term bone marrow cultures: Biochemical and ultrastructural analysis. *Blood* 67:33.

Wilkins, B. and Jones, D. 1995. Vascular networks within the stroma of human long-term bone marrow cultures. *J Pathol* 177:295.

Wolf, N. and Prestley, S. 1986. Kinetics of early and late spleen colony development. *Exp Hematol* 14:676.

Zsebo, K., Williams, D., Geissler, E., Broudy, V., Martin, F. and Atkins, H. 1990. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63:213.

Zuckerman, K. and Wicha, S. 1983. Extracellular matrix production by adherent cells of long-term murine bone marrow cell cultures. *Blood* 61:540.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## APENDICES

### APENDICE 1

#### ENSAYO DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY).

1. Estabilizar las inmunoplasmas (Costar, USA) con 100  $\mu$ l/pozo de medio condicionado o bien con 50, 25 o 12 ng de las citocinas recombinantes GM-CSF, PDGF, M-CSF e IL-1 $\alpha$ , diluido en amortiguador de carbonatos pH 9.5 (apéndice 3).
2. Incubar 2 hr a 37°C y después toda la noche a 4°C.
3. Lavar 4 veces con SAF-TWEEN preparada al 0.1%.
4. Bloquear con 100  $\mu$ l/pozo de SAF-albúmina preparada al 2% durante 1 hr a 37°C.
5. Lavar 4 veces con SAF-TWEEN preparada al 0.1%.
6. Adicionar 100  $\mu$ l/pozo del primer anticuerpo diluido en SAF-albúmina al 2% a una concentración de 1:200. Incubar durante 1 hr a 37°C. Para las citocinas a determinar se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón (Genzyme, USA) para cada una de ellas.
7. Lavar con SAF-TWEEN preparada al 0.1%.
8. Adicionar 100  $\mu$ l/pozo del conjugado (anticuerpo secundario-enzima peroxidasa) diluido con SAF-albúmina a una concentración de 1:3000. Incubar ½ hr a 37°C.
9. Lavar 4 veces con SAF-TWEEN preparada al 0.1%.
10. Adicionar el sustrato de la enzima (OPD, orto-phenylenediamina): Disolver 6 mg de sustrato en 12 ml de amortiguador de citratos pH 5.6 (apéndice 4). Adicionar 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inmediatamente antes de usarse. Agregar a la placa 100  $\mu$ l/pozo de a solución y mantenerla en la obscuridad durante 10 min.
11. Parar la reacción con 25  $\mu$ l/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> preparado a 2.5 N.
12. Leer a 490 nm.

## APENDICE 2

### SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (SAF)

Esta solución amortiguadora se utiliza para mantener condiciones fisiológicas estables a un pH de 7.0 por periodos que no excedan las 2 horas. La capacidad de amortiguación es proporcionada por las sales de fosfato, de acuerdo a la siguiente formulación:

Cloruro de Sodio (NaCl)	8.0 g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.2 g
Fosfato Monoácido de Sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	2.16 g
Fosfato Diácido de Potasio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	0.2 g

Todos los componentes se disuelven en 1000 ml de agua bidestilada, ajustándose el pH entre un valor aproximado de 7.2-7.4 con HCL 8N. La solución es esterilizada con membranas Millipore con diámetro de 0.22 micras. La solución se almacena a 4°C hasta su uso.

## APENDICE 3

### SOLUCION AMORTIGUADORA DE CARBONATOS

Esta solución se utiliza para estabilizar las inmunoplasmas en el ensayo de ELISA, y se prepara de la siguiente manera:

Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	4.24 g
Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	5.04 g

Todos los componentes se disuelven en 1000 ml de agua bidestilada, ajustándose a un pH de 9.5. Se almacena a 4°C hasta su uso.

#### APENDICE 4

#### SOLUCION AMORTIGUADORA DE CITRATOS

Esta solución se utiliza para disolver el sustrato de la enzima peroxidasa (OPD, orto-phenylenediamina) en el ensayo de ELISA, y se prepara de la siguiente manera:

Acido Citrico ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ )	21.01 g
Fosfato Monoácido de Sodio ( $Na_2HPO_4$ )	28.4 g

Se preparan soluciones stock de ácido citrico y fosfato monoácido de sodio en 1000 ml de agua bidestilada cada una por separado. Se toman 48.5 ml de la solución de ácido citrico y se agregan a 51.5 ml de la solución de fosfato monoácido de sodio. Se ajusta a un pH de 5.6 y se almacena a 4°C hasta su uso.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Mario Gutiérrez por permitirme colaborar con su equipo de trabajo y apoyarme fuertemente durante toda la maestría.**

**A la Maestra en Ciencias Ma. de Lourdes Mora, al Dr. Jorge Flavio Mendoza y al Dr. Benny Weiss, por su asesoramiento y consejos durante el desarrollo del trabajo.**

**A los Drs. Martínez Medellín, Rodrigo Zambrano, Enrique Miranda, Patricia Ostrosky y Alejandra Mainero, quienes formaron parte del jurado y contribuyeron en el mejoramiento del trabajo escrito.**

**A Elizabeth Morales, Adolfo Martínez, Rocio Hernández y Ranulfo Pedraza por su colaboración técnica.**

**A la Bióloga Ma. del Carmen Galindo por su asesoramiento en la parte estadística del trabajo.**

**Al Dr. López Valero del Servicio de Ortopedia, Hospital General de México, por su ayuda y colaboración en la obtención de muestras de médula ósea.**