

00377
10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE LA ISOFORMA DEL GEN
WT1 PRESENTE EN LA LEUCEMIA MIELOBLASTICA
AGUDA

300095

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A :
MARTA ELENA HERNÁNDEZ CABALLERO

DIRECTORA DE TES'S: DRA. ROSENDA ISABEL PERAZCOZA ESPINOSA



COORDINACION
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
NOVIEMBRE, 2001

MÉXICO, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de septiembre de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna HERNANDEZ CABALLERO MARTA ELENA con número de cuenta 99809652, número de expediente 39910520, con la tesis titulada: "CARACTERIZACIÓN DE LA ISOFORMA DEL GEN WT1 PRESENTE EN LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA", bajo la dirección de la DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA.

Presidente: Dra. Sara Frías Vázquez
Secretario: Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa
Vocal: Dr. Héctor Mayani Viveros
Suplente: Dr. Mario Altamirano Lozano
Suplente: Dr. Rafael Camacho Carranza

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de noviembre de 2001


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo fue apoyado por el IMSS con el Oficio No 09-B5-61-2800/ y por CONACYT con el No de proyecto 30945M.

Comité Tutorial:

Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa

Dra. Sara Frías Vázquez

Dr. Mario Altamirano Lozano

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosenda Peñaloza Espinosa por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Genética Humana y por su apoyo.

Al Dr. Diego Arenas Aranda por todo lo que me enseñó, por su apoyo y amistad.

Al Dr. Hector Mayani Viveros por proporcionarme las muestras para este trabajo y por su apoyo.

Al M. en C. Juan José Montesinos y a la Biol. Patricia Flores por ayudarme con la purificación de las células.

A los biólogos Rafael Martínez y Pablo Hoffman por enseñarme algunas técnicas.

Al Dr. Ramón Coral por ayudarme con algunas dudas.

A la Biol. Carmen Álvarez por apoyarme cuando lo necesité.

A los compañeros que de alguna manera me apoyaron durante este tiempo.

Finalmente, gracias al apoyo económico del IMSS para la realización de esta tesis.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Estructura del gen WT1	2
Transcritos del gen WT1	3
Procesamiento alternativo del transcrito de WT1	3
Isoforma WT1+KTS	5
Isoforma WT1-KTS	6
Isoformas WT1+17aa/-17aa	7
Edición del RNA mensajero	8
Sitios alternativos para el inicio de la traducción	8
Proteína wt1	9
Expresión del gen WT1	10
Hematopoyesis	11
Leucemia mieloblástica aguda	13
Factores de crecimiento hematopoyético	16
ANTECEDENTES	17
Participación del gen WT1 en la proliferación y diferenciación hematopoyética	17
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
METODOS	21
Purificación de células CD34 ⁺ lin ⁻	21
Cultivo de las células CD34 ⁺ lin ⁻ con factores de crecimiento	22
Aislamiento de RNA total	23
Determinación del transcrito del gen WT1, mediante RT-PCR	23
Determinación semicuantitativa de los transcritos del gen WT1	24
Extracción de fragmentos en gel de poliacrilamida	25
Cuantificación de los productos purificados	26

Secuenciación	26
RESULTADOS	28
Identificación de las isoformas de WT1 presentes en células CD34 ⁺ lin ⁻ de pacientes con LMA	28
Determinación de las concentraciones relativas de las isoformas del RNAm de WT1	33
Determinación de las concentraciones de las isoformas del RNAm de WT1 en las células derivadas en cultivo, a partir del linaje CD34 ⁺ lin ⁻	36
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	53
APÉNDICE	54
REFERENCIAS	56

RESUMEN

El gen supresor WT1 es importante en la formación del sistema urogenital, su expresión en tejidos de origen mesodérmico permite el inicio de la diferenciación en estos. Por medio de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales WT1 puede dar lugar a varias proteínas, funcionalmente diferentes y que reconocen distintas secuencias de unión a DNA. Hasta ahora las proteínas más estudiadas son las 4 generadas por el procesamiento alternativo del RNAm y son: WT1+17aa+KTS, WT1+17aa-KTS, WT1-17aa+KTS y WT1-17aa-KTS.

En años recientes se ha estudiado la participación de este gen en los procesos de proliferación y diferenciación celular hematopoyéticos, y su papel en la leucemia donde se encuentra sobreexpresado, específicamente en las células inmaduras CD34⁺, células en las que se ha sugerido, puede bloquear el proceso de diferenciación. Actualmente existen pocos trabajos sobre su función en células hematopoyéticas normales y de pacientes con leucemia.

Por lo anterior los objetivos de este estudio fueron: 1) Identificar las isoformas del gen WT1 en células leucémicas CD34⁺lin⁻ y 2) Determinar las concentraciones relativas de esas isoformas en estas células, 10 y 20 días después de ser expuestas a los factores de crecimiento hematopoyético, G-CSF y GM-CSF. Para lo cual se analizaron 11 aspirados de médula ósea de pacientes adultos con leucemia mieloblástica aguda sin tratamiento previo y 5 muestras de sangre de cordón umbilical, como control normal. El RNA total obtenido una vez purificadas las células CD34⁺lin⁻, fue amplificado por RT-PCR utilizando α^{32} P-dCTP durante la reacción, coamplificando un fragmento del RNAm del gen β -actina como control interno. Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis y analizados utilizando un método semicuantitativo. La identidad de los fragmentos fue verificada por secuenciación.

Como resultado se observó la presencia de los 4 transcritos correspondientes a la inserción y la ausencia de inserción, de los 51 pb del exón 5 (+17aa, -17aa) y de los 9 pb en el extremo del exón 9 (+KTS, -KTS), en todas las células leucémicas y de cordón umbilical. Las isoformas predominantes fueron las que presentaron la inserción en ambos exones. Mediante la prueba estadística no paramétrica de U de Mann-Whitney se encontró una diferencia significativa en el nivel de expresión de las 4 isoformas en las células leucémicas con respecto a las células de cordón umbilical y las células de médula ósea leucémica. Por otra parte, se cultivaron 4 muestras de células leucémicas con los factores de crecimiento hematopoyético y se observó que la expresión de las isoformas de WT1 fue diferente en todos los pacientes, por lo que no fue posible establecer un patrón de expresión de WT1 en estas células. La relación de la expresión entre las isoformas presentó más variación para las isoformas +17aa/-17aa, con una relación en el día 0 de $x = 2:1$; $x = 3.4:1$, en el día 10 de cultivo y $x = 2.6:1$ en el día 20. Mientras que la relación en la expresión de las isoformas +KTS/-KTS mostró una disminución de $x = 2.6:1$ en el día 0; $x = 2.3:1$, en el día 10 a $x = 2.1:1$ en el día 20.

Todas las células mostraron características morfológicas de diferenciación hacia el linaje granulocítico y monocítico a partir de los 10 días de cultivo.

En conclusión tanto las células leucémicas como las normales expresan las mismas isoformas, aunque su expresión es mayor en las leucémicas, en todos los casos la isoforma +17aa+KTS fue la más abundante y la presencia de las isoformas de WT1 no interfiere con el proceso de diferenciación. En lo que respecta al número de células, de acuerdo a lo señalado por Kudoh y col., (1996), posiblemente exista un nivel umbral en su expresión que favorezca el aumento en el número de células.

INTRODUCCION

Actualmente el conocimiento de qué son y cómo funcionan los genes supresores de tumores ha llevado al descubrimiento de nuevas y diversas funciones para algunos de ellos.

Entre la creciente familia de genes supresores, el gen WT1 presenta características únicas, debido a que no solo está involucrado en la etiología de diversos tumores y síndromes, sino también en la formación de órganos en el sistema urogenital (Englert, 1998). La presencia de mutaciones en el gen ó la inactivación de su función predisponen a la formación de tumores como los mesoteliomas, melanomas, cáncer ovárico, tumor de Wilms y algunas leucemias (Inoue y col., 1996). Además se expresa en síndromes asociados con el tumor de Wilms entre los que se encuentran, el Síndrome de WAGR, que se caracteriza por la presencia de este tumor, aniridia, anomalías genitales y retraso mental (Hastie, 1993), el síndrome de Denys-Drash, el de Wiedeman-Beckwit y el de Frasier, donde las características en común para estos padecimientos son las anomalías genito-urinarias (Bergmann y col., 1997).

Al inicio de la década pasada se hizo evidente que el gen WT1 podría tener una participación importante tanto en hematopoyesis, como en neoplasias de las células hematopoyéticas, debido a que se expresa en ambos tipos celulares. En la actualidad se investiga su papel en el proceso leucemogénico, de lo que ha surgido la posibilidad de que WT1 participe en la regulación de la respuesta apropiada a la señalización para el crecimiento y a los factores de diferenciación celular.

Estructura del gen WT1

Gracias al análisis molecular de un gran número de deleciones asociadas con el síndrome de WAGR, el gen WT1 fue localizado en el brazo corto del cromosoma 11, en la región 13 (Reddy y Lich, 1996). Posteriormente se determinó que el locus WT1 consistía de 50 kilobases donde se distribuyen 10 exones (Figura 1). El análisis de la secuencia de clonas de cDNA reveló un marco de lectura abierto de 1347 pb (449 aminoácidos) (Haber y col., 1991).

El gen codifica para una proteína con dos motivos estructurales, un dominio con una alta concentración de prolina y glutamina en el exón 1 y cuatro dedos de zinc de la variedad Cys₂-His₂ en los exones 7 a 10 (Huff y Sanders, 1993). Su promotor es similar al de otros genes supresores, como Rb y p53, ya que no contiene caja CCAAT ni caja TATA, sino un alto contenido de GC (Reddy y Licht, 1996).

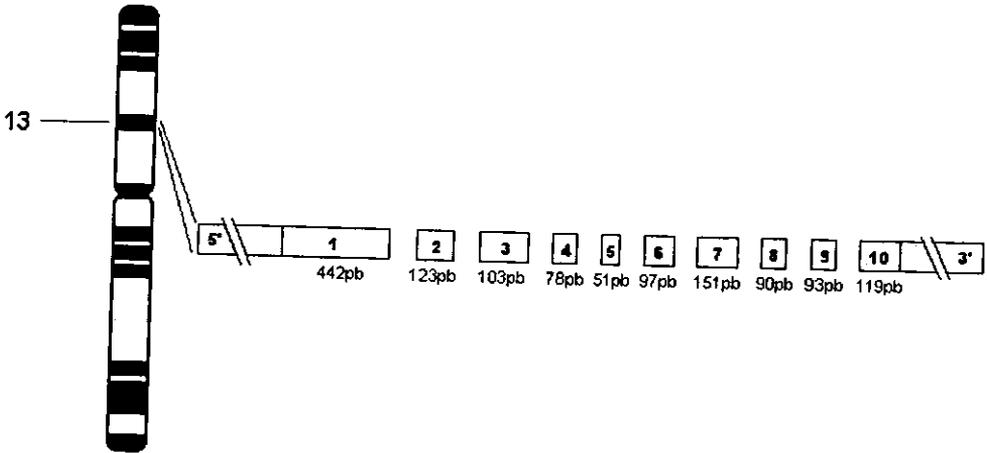


Figura 1. Localización del gen WT1 en el brazo corto del cromosoma 11 en la región 13, este gen consta de diez exones distribuidos en 50kb.

Transcritos del gen WT1

El gen WT1 es capaz de dar lugar a varias isoformas de la proteína a través de la combinación de: A) Procesamiento alternativo del RNAm ("splicing") en los exones 5 y 9; B) Edición de RNA (Hastie, 1994) y C) Diferentes sitios para el inicio de la traducción (Bruening y Pelletier, 1996).

A) Procesamiento alternativo del transcrito de WT1

El procesamiento alternativo es una de las modificaciones más notables que se presenta durante la maduración del RNAm de los mamíferos, especialmente por la habilidad para seleccionar los pares de bases precisos para los sitios del procesamiento alternativo entre innumerables sitios potenciales e inapropiados que pueden encontrarse (Blencowe, 2000). Es un fenómeno ampliamente utilizado para la regulación de los factores de transcripción. Las características funcionales que pueden ser modificadas por este mecanismo incluyen, la afinidad y especificidad de unión al DNA, las propiedades de activación y represión y la dimerización de proteínas. Además, las isoformas de algunos factores de transcripción pueden ser expresadas a niveles constantes o cambiar durante el desarrollo, o entre diferentes tejidos (Renshaw y col., 1997).

El transcrito del gen WT1 presenta dos sitios de procesamiento alternativo por lo que pueden formarse cuatro proteínas diferentes (Figura 2). Estas proteínas tienen diversas secuencias de unión en el DNA blanco y propiedades transactivacionales variables (Reddy y Licht, 1996).

El procesamiento alternativo I ocurre en el extremo 5' e involucra al exón 5 y la variante puede o no presentar a los 17 aminoácidos que lo constituyen (Haber y col., 1991; Rupprecht, y col., 1994). El procesamiento alternativo II en el extremo 3' involucra el uso de un sitio alternativo donador de bases y resulta en la inserción de 9 pares de bases que codifican para los aminoácidos: Lys-Thr-Ser (KTS) en el extremo del exón 9 entre los dedos de zinc 3 y 4 (Reddy y Licht, 1996). La nomenclatura empleada para designar a las proteínas que se generan por este mecanismo es variable.

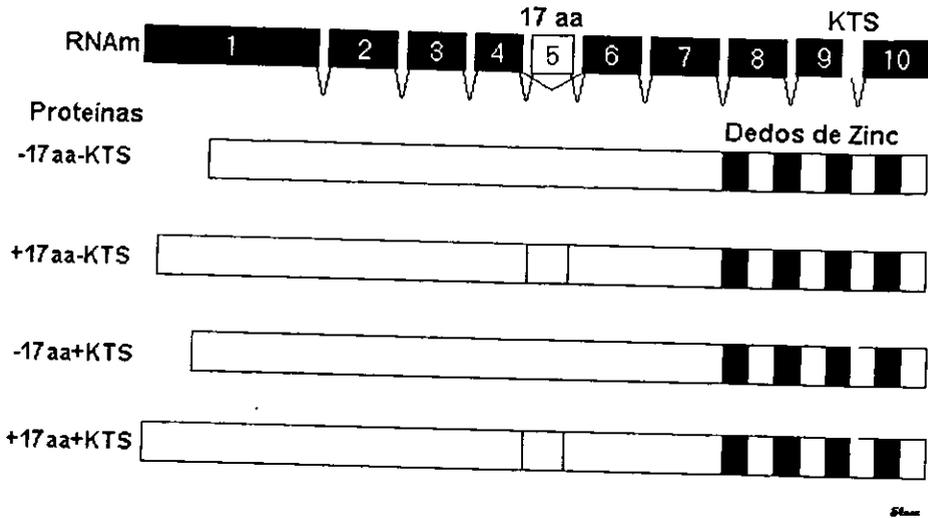


Figura 2. Estructura del RNAm y las cuatro proteínas que se forman a través de la inserción o eliminación de 17 aa codificados en el exón 5 y de 3 aa (KTS) codificados en el exón 9. Modificado de Reddy y Licht (1996).

Desde el punto de vista evolutivo, la inserción del exón 5 es un proceso de adición tardía a la función del gen, ya que esta inserción sólo se presenta en mamíferos placentarios (Renshaw y col., 1997). De manera interesante, ocurre lo contrario con el segundo procesamiento, que se encuentra altamente conservado desde los peces hasta los mamíferos, con un único cambio en una base, que no altera la secuencia de aminoácidos de la proteína (Davies y col., 2000).

Las diferentes isoformas se localizan en distintas regiones en el núcleo, en manchas o gránulos intercromatinianos y en cuerpos espiralados (Larsson y col., 1995).

Isoforma WT1+KTS

La isoforma más abundante WT1+KTS se localiza en los cuerpos espiralados, descritos como cuerpos nucleolares accesorios que participan en el ensamblaje, maduración y reciclamiento del complejo del "spliceosoma". Se asocia con componentes de la maquinaria del procesamiento alternativo pre-RNAm, es decir, con las

ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, específicamente con el factor U2AF65, donde funciona a través de la unión a RNA (Davies y col., 1998). Es posible que participe en el metabolismo del RNA, en el transporte del RNAm o que influya directamente el procesamiento alternativo (Larsson y col., 1995).

La isoforma WT1+KTS se une débilmente y con poca especificidad al DNA, debido a la inserción de KTS, la cual evita que el cuarto dedo tenga una interacción óptima con su sitio de unión afin en la hendidura mayor del DNA, mientras que WT1-KTS se une con alta afinidad a la secuencia blanco GCGGGGGCG que también es reconocida por los factores de respuesta al crecimiento temprano (EGR) (Laity y col., 2000). WT1+KTS reprime la transcripción del factor de crecimiento semejante a insulina tipo II (IGF-II) (Drummond y col., 1994).

Isoforma WT1-KTS

WT1-KTS se localiza en dominios de factores de transcripción, mostrando una distribución paralela a los factores Sp1 y TFIIIB, participa en la regulación de la transcripción (Larsson y col., 1995).

WT1-KTS se relacionó con una función apoptótica y su expresión en riñón fetal de ratón incrementó la tumorigenicidad (Menke y col., 1997). Cuando se indujo su expresión en células de osteosarcoma reprimió la transcripción del receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFR) y redujo la síntesis del EGFR endógeno, seguido por la inducción de apoptosis. Sin embargo, la apoptosis mediada por WT1 en esas células se eliminó con la expresión constitutiva de EGFR, lo que sugirió que la muerte pudo deberse a la falta del factor de crecimiento epidermal y a otras señales de sobrevivencia (Englert y col., 1995). WT1-KTS es la isoforma que afecta la progresión del ciclo celular, ya que al inducir su expresión se indujo la expresión de la proteína p21 endógena (proteína asociada con la detención del ciclo celular en G₁). Este efecto fue independiente de la inducción de p21 mediada por p53. La proteína p21 ha sido considerada un intermediario importante en la diferenciación de las células hematopoyéticas y musculares, donde participa en la salida del ciclo, antes de la activación de la vía de diferenciación. Por lo que, la pérdida de la vía WT1-p21 pudo privar a la célula de un punto de revisión en el ciclo y contribuir a su transformación

(Englert y col., 1997). Posteriormente, Lee y col. (1999) apoyaron la sugerencia de que WT1-KTS podía funcionar como un activador transcripcional de promotores específicos, como sucede con p21 y Hsp70, más que como un represor.

Isoformas WT1+17aa y -17aa

A diferencia de las variantes +KTS y -KTS, existe poca información sobre los efectos funcionales para la presencia de +17aa o -17aa, un posible papel se encuentra en la regulación del crecimiento por detención del ciclo celular e inducción de la apoptosis en células embrionarias (Renshaw y col., 1997).

Aunque ambas isoformas +17aa+KTS y +17aa-KTS pueden reprimir la expresión del propio gen al unirse a varios sitios en la región promotora, la inserción 17aa le confirió una función represora adicional a WT1+17aa+KTS, mientras que en ausencia de la inserción la isoforma WT1-17aa-KTS fue un represor menos eficiente (Hastie, 1994), debido a que la inserción 17aa funcionó como un dominio de represión independiente (Wang, y col., 1995). En análisis de transfección la presencia de +17aa confirió a la proteína mayor actividad para bloquear el ciclo celular e inhibir el crecimiento celular, inhibiendo fuertemente la proliferación celular, de manera dependiente de la expresión de WT1 a un nivel umbral (Kudoh y col., 1995; 1996). La isoforma que contiene únicamente a +17aa parece ser la isoforma más potente en la inducción de la muerte celular (Englert y col., 1995). WT1-17aa regula de manera negativa el crecimiento y la sobrevivencia celular, mientras que las isoformas WT1+17aa promueven la diferenciación celular (Hewitt y Saunders, 1996). La sobreexpresión de WT1+17aa-KTS indujo el bloqueo en G₁ y apoptosis en células de leucemia mieloblástica M1 (Murata y col., 1997).

Esto sugiere que el papel de WT1 en la regulación de la transcripción de genes que regulan el crecimiento y la muerte celular apoptótica, varía dependiendo del tipo de célula leucémica en el cual se expresa (Murata y col., 1997).

Sin embargo, aún existe desacuerdo en la función que pudiera desempeñar esta inserción, actualmente se considera que aún no se determina su efecto sobre la función de la proteína (Laity y col., 2000).

Las variantes que contienen el exón 5 se expresan en un 65%, y en un 80% las que contienen a KTS (Habert y col., 1993). La isoforma más abundante, al menos a nivel de RNAm es WT1+17aa+KTS, mientras que la isoforma sin el tripéptido KTS (WT1+17aa-KTS) representa el 23% del RNAm (Hewitt y col., 1996).

Las isoformas se expresan en una proporción constante, la proporción +KTS/-KTS es $\approx 3.3:1$ (Haber y col., 1991), ó 1.6:1 de acuerdo a los resultados encontrados por Renshaw y col. (1997) en leucemia aguda. La proporción de +KTS/-KTS fue más alta en el sistema hematopoyético que en el sistema genitourinario (Renshaw y col., 1997).

Klamt y col. (1998), encontraron que un desequilibrio en la proporción de isoformas WT1+KTS/-KTS, debido a una alteración en el procesamiento del exón 9 llevó a una duplicación en la producción de la isoforma WT1-KTS con respecto a la otra, y que esto fue suficiente para causar el Síndrome de Fraiser. Esto proporcionó la evidencia de que el mantenimiento de la proporción adecuada de cada proteína es crucial para su función.

B) Edición del RNA mensajero.

En la edición de RNAm un residuo de uracilo en la posición 1222 puede ser editado, es decir, cambiado por una citosina, lo cual lleva al reemplazo de una leucina en el exón 6 por una prolina (Englert, 1998).

C) Sitios alternativos para el inicio de la traducción.

La presencia de dos sitios alternativos para el inicio de la traducción aumenta el número de isoformas posibles y lleva a la formación de más proteínas. El primer sitio de inicio corresponde a un codón AUG, mientras que el segundo sitio de inicio corresponde a un codón no AUG hacia el extremo 5' del iniciador, lo que agrega 68 residuos en el extremo amino (Bruening y Pelletier, 1996). El peso molecular de las proteínas varía en los reportes de 49-51 kDa, 52-54 kDa (Reddy y Licht, 1996) a 52-65 kDa (Englert, 1998). Recientemente se localizó un sitio más para el inicio de la traducción, ubicado hacia el extremo 3' del iniciador, un AUG interno, formándose proteínas más pequeñas. De esta manera se lleva a 32 el número de proteínas generadas tanto por edición, diferentes

sitios para el inicio de la traducción y procesamiento alternativo, y se incrementa la complejidad de la expresión de WT1 (Scharnhorst y col., 1999).

Proteína WT1

La proteína wt1 puede activar o reprimir la transcripción gracias a su dominio rico en prolina/glutamina (Figura 3), dependiendo del tipo celular, el promotor blanco y el tipo de isoforma de wt1 (Reddy y Linch, 1996). Cada dedo de zinc está compuesto de una lámina β antiparalela, con dos cisteínas consenso y una α -hélice con dos histidinas consenso, ésta conformación es similar a la encontrada en reguladores de la transcripción como el gen de respuesta al crecimiento temprano 1 (EGR1), EGR2 (Krox-20), Sp1, GLI y Krüppel (Little y col., 1992).

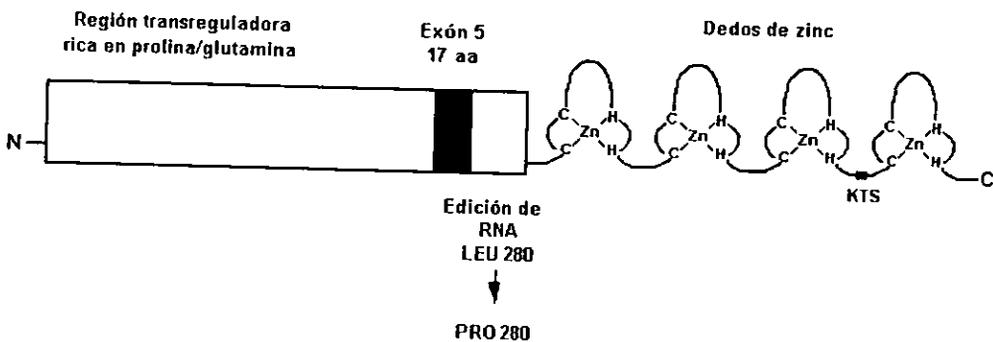


Figura 3. Estructura de la proteína wt1 donde se muestran, la región rica en prolina y glutamina en el extremo amino terminal y los cuatro dedos de zinc en su extremo carboxilo (Tomada de Hastie, 1994).

El primer dedo de zinc de WT1 tiene homología con el primer dedo de zinc de Sp3 (perteneciente a la familia Sp1), mientras que los últimos tres dedos son similares a los de EGR1 y EGR2. Por esta alta homología WT1 es considerado también como un factor de transcripción que se une a DNA (Coppes y col., 1993). Activa y reprime a promotores ricos en GC, al unirse a la secuencia blanco 5'-GCGGGGGCG-3'. En el promotor de la cadena α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- α) se identificó un

segundo sitio de unión a DNA TCCTCCTCC, que también está presente en otros promotores y puede ser blanco para WT1 en análisis de transfección transitoria (Moffett y col., 1995). Presenta una región conservada de cierre (zipper) de leucina hacia el extremo 5' de los dedos de zinc, con el cual puede llevar a cabo dimerización con otras proteínas wt1 y con proteínas diferentes (Hastie, 1994).

Entre los genes blanco para la represión de su transcripción se encuentran el receptor α del ácido retinoico (RAR- α), PAX2, c-myc, bcl-2 (Hewitt y col., 1996), la cadena α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- α), el factor 1 estimulante de colonias, (CSF-1), que estimula la proliferación, diferenciación y actividad de progenitores mieloides, el factor II de crecimiento semejante a insulina (IGF-II), el factor de crecimiento transformante β -1 (TGF- β -1), y el propio WT1 (Inoue y col., 1998). En algunos casos, puede activar la expresión de genes, como se demostró por la sobrerregulación del PDGF2 (Bergmann y col. 1997).

La proteína del gen WT1 tiene la capacidad para unirse a la proteína p53, aumentando la habilidad de p53 para activar la transcripción e inhibiendo su habilidad para mediar la muerte celular programada inducida por un daño (Reddy y Licht, 1996).

Es posible que WT1 tenga otras funciones, como lo sugirieron Reddy y Licht (1996) quienes propusieron que también podía inhibir la replicación del DNA y por lo tanto participar en el control de la proliferación celular y Caricasole y col. (1996) quienes sugirieron que WT1 podía tener una función reguladora postranscripcional, ya que la ausencia del dedo de zinc 1 impidió la unión al RNA.

Se encontró que las mutaciones en el gen, podían llevar a la formación de proteínas con efectos dominantes o dominantes negativos, al interferir con la función de la proteína normal y que la regulación *in vitro* de la expresión de WT1 podía inhibir o estimular la apoptosis dependiendo de la isoforma utilizada y del tipo celular (King-Underwood y col., 1998).

Expresión del gen WT1

El gen WT1 se expresa en tejidos de origen mesodérmico, en células que sufren una transición de mesénquima a epitelio y es esencial para la supresión del desarrollo de músculo en los riñones (Hastie, 1994).

En el desarrollo embrionario se expresa durante la organogénesis del riñón, en la condensación del mesénquima metanéfrico alrededor de las yemas uretéricas para su diferenciación en células epiteliales que formarán los túbulos proximales y distales y el glomérulo de la nefrona, sólo dentro del linaje de la nefrona y la capa epitelial de podocitos del glomérulo, en las células estromales de las gónadas, bazo, células inmaduras de la médula ósea y cubierta mesotelial del intestino, corazón y pulmones.

Se expresa en casi todos los linajes de mesodermo caudal, posiblemente con excepción de la notocorda (Hastie, 1993). Además, se localizó su expresión en un pequeño segmento de músculo, dos bandas simétricas de células que corren a lo largo del cordón espinal y en una región del cerebro, donde no se conoce que función pudiera desempeñar (Hastie, 1994).

La expresión de WT1 esta estrechamente regulada tanto espacial como temporalmente a lo largo del desarrollo embrionario y en el estado adulto (Huff y Saunders, 1993), ya que la presencia de la proteína es necesaria para mantener la función del riñón en la vida adulta (Hastie, 1994).

El RNAm puede ser detectado en altos niveles a las 20 semanas de desarrollo, durante la formación del sistema genitourinario y estructuras de soporte de origen mesodérmico (Hastie, 1993). En el adulto la expresión de este gen se restringe a algunas células del riñón (podocitos) y la gónada (Células de Sertoli y células de la granulosa), en niveles mucho más bajos en el bazo, corazón, pulmones, timo (Walker y col., 1994) y, la médula ósea, donde está confinado a células hematopoyéticas inmaduras CD34⁺ (Inoue y col., 1994).

Hematopoyesis

Comprender cómo las células madre hematopoyéticas pluripotenciales sufren restricciones progresivas en el potencial de linaje y adquieren las características de células maduras, terminalmente diferenciadas, es central para dilucidar su participación en diversos padecimientos hematopoyéticos.

La hematopoyesis es el proceso por el cual las células sanguíneas adquieren fenotipos definidos, como resultado de la expresión coordinada de genes específicos para cada tipo celular. El patrón de expresión de genes dentro de una célula es

establecido por factores de transcripción célula-específicos, que median el efecto global de una variedad de señales de proliferación y diferenciación. Algunos de los factores involucrados son GATA-2, esencial para la expansión de células hematopoyéticas tempranas; PU.1, importante para la diferenciación mieloide de progenitores CD34⁺; NF-E2, presente en megacariocitos, regula la maduración citoplásmica, formación de gránulos y desarrollo de plaquetas; el gen *Ikarus*, que media la diferenciación en estados tempranos de maduración de todos los linajes linfoides y, genes miembros de la familia HOX, están involucrados en sobrevivencia y control de la proliferación celular (Shivdasani y Orkin, 1996). Recientemente, el factor de transcripción WT1 fue incluido entre los genes involucrados en el proceso de diferenciación hematopoyética (Baird y Simmons, 1997).

Además de los factores de transcripción, se requiere de otras proteínas para la diferenciación, entre las que son esenciales los factores de crecimiento G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina y eritropoyetina, el receptor de tirosina cinasa, Flk-1 y la cinasa Janus Jak3 (Shivdasani y Orkin, 1996).

El mantenimiento de la hematopoyesis se lleva a cabo por escasas células madre pluripotenciales, que tienen un gran potencial de desarrollo y proliferación (Bhatia, y col., 1998). Las células madre se dividen en dos subgrupos, uno capaz de autorenovación indefinida (células multipotenciales a largo plazo) y otro que se autorenewa durante un intervalo definido (células reconstitutivas a corto plazo), este último da origen a una progenie, que tiene más restringido su potencial de diferenciación, y que a su vez origina a las células funcionalmente maduras (Figura 4) (Weissman, 2000).

Las células madre hematopoyéticas sólo representan una fracción de las células presentes en la médula ósea, aproximadamente 0.05% y carecen de marcadores de linaje hematopoyético (lin⁻), (Huss, 2000).

La sangre de cordón umbilical también es una fuente de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) y a partir de los años 90 se considera como una alternativa al trasplante de médula ósea (Mayani y Lansdorp, 1998).

El sello que define a las células HSPC es una glicoproteína integral de membrana, el antígeno CD34. Esta molécula puede funcionar como un regulador de la adhesión celular hematopoyética a las células del estroma en la médula ósea. Este marcador es

regulado de forma negativa cuando las células se diferencian en células más maduras (Krause y col., 1996).

Las hemopatías clonales retienen muchas de las características del desarrollo hematopoyético, al presentar una organización jerárquica, semejante a la que se observa en la hematopoyesis normal. Sin embargo, su programa de diferenciación es anormal debido a que no producen células funcionales (McCulloch, 1983).

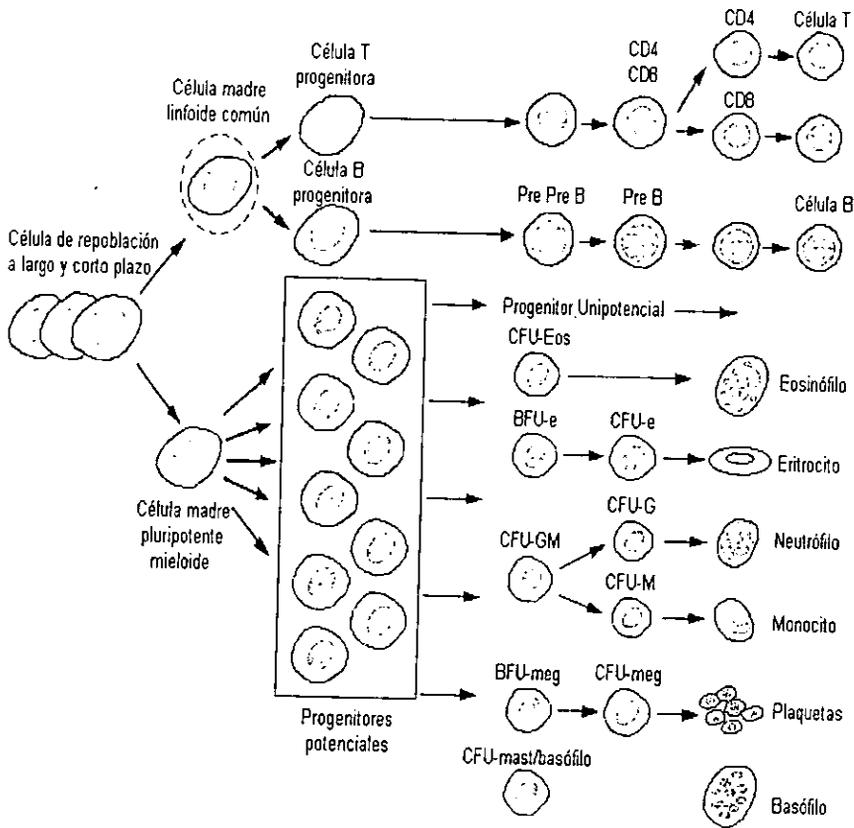


Figura 4. Formación de los diferentes linajes de células hematopoyéticas maduras desde una célula hematopoyética primitiva (Tomada de Williams, 1995).

Leucemia mieloblástica aguda

Se cree que los genes involucrados en la patogénesis del cáncer actúan a través de dos mecanismos generales. El primero involucra la alteración estructural de un gen normal, del cual se genera una proteína que actúa sobre la célula hospedera para inducirle características de malignidad. Esta proteína generalmente está involucrada con la proliferación, diferenciación o sobrevivencia. El segundo mecanismo se relaciona con la pérdida o inactivación de genes cuyas proteínas suprimen el cáncer (Cline, 1994).

La leucemia es considerada un tipo especial de cáncer. Algunos defectos genéticos heredados están asociados con una predisposición familiar al cáncer, mientras que muchos de los defectos genéticos que aumentan la probabilidad de padecer leucemia, son adquiridos (Cline, 1994).

Los genes potencialmente leucémicos en las células hematopoyéticas pueden ser agrupados en: genes que transmiten señales que estimulan el crecimiento, desde la membrana hasta el núcleo; genes que activan la transcripción, cuyas proteínas se unen a secuencias específicas de DNA, cerca de genes blanco y potencian la síntesis de RNAm; genes involucrados en la diferenciación de tejidos; genes involucrados en muerte celular programada y genes supresores de tumores (Cline, 1994).

Los desordenes de las células madre hematopoyéticas incluyen a diversos padecimientos, entre los que se encuentran las leucemias agudas. Este grupo de padecimientos difiere en etiología, patogénesis, historia natural y pronóstico. Son clasificados con base en la morfología, citoquímica, marcadores inmunológicos y citogenéticos o combinación de estas características. La clasificación generalmente utilizada fue propuesta por hematólogos franceses, americanos y británicos (FAB) y divide a las leucemias en dos grupos: leucemias agudas linfoblásticas y leucemias mieloides, estas últimas a su vez se clasifican en ocho subtipos: de M0 a M7 (Jiménez, 1998), esta clasificación se basa en la apariencia morfológica de los blastos.

Las leucemias mieloides agudas son causa del 15 al 20% de las leucemias agudas en los niños y del 80% en los adultos, y es ligeramente más común en los hombres (Williams, 1995).

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) es el resultado de cambios genéticos en una célula madre hematopoyética, lo que conlleva a un crecimiento descontrolado y a un

bloqueo en la diferenciación terminal (Sutherland y col., 1996). Las células se derivan de una clona leucémica, que substituye la hematopoyesis normal por células inmaduras, incapaces de diferenciarse en granulocitos o monocitos funcionales, se caracteriza por la proliferación de blastos anormales principalmente en la médula (Figura 5), donde constituyen más del 70% de las células y por la producción alterada de células sanguíneas normales (Williams, 1995). Los blastos leucémicos tienen núcleos de irregulares a redondos, un nucleolo distintivo y muy poco citoplasma. El citoplasma frecuentemente contiene finos gránulos azurófilos y un número variable de cuerpos o batones de Auer (inclusiones citoplásmicas elípticas) (Williams, 1995; Löwenberg y col., 1999).

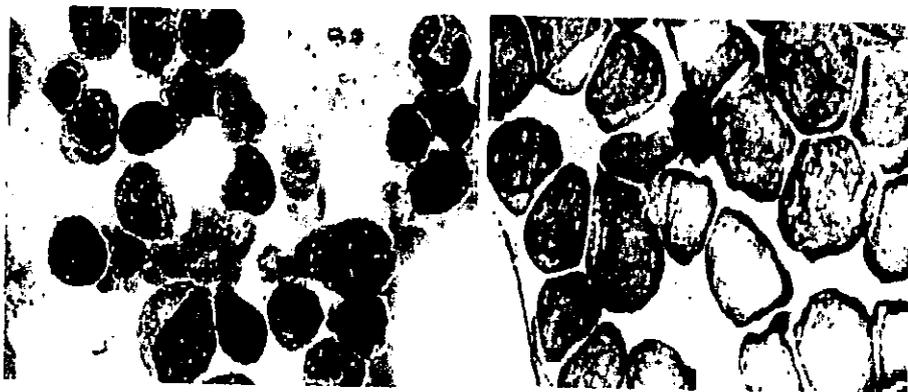


Figura 5. Médula ósea normal y su contraparte leucémica, se observa el gran número de blastos en la médula leucémica.

Existen evidencias para la existencia de una jerarquía en la clona leucémica, similar a la que se observa en la hematopoyesis normal y que son las células madre normales quienes sufren la transformación leucémica. La naturaleza del defecto genético es la que determina el programa de diferenciación de la clona leucémica. De modo que, una pequeña subpoblación de células madre leucémicas que posee una amplia capacidad proliferativa y el potencial para la autorenovación, mantiene la leucemia, ya que los blastos leucémicos tienen una capacidad heterogénea para

proliferar, un periodo de vida corto y una habilidad variable para madurar más allá del estado de blasto o progranulocito (Figura 6) (Lapidot y col., 1994; Sutherland y col., 1996; Bonnet y Dick, 1997). Fraizer y col. (1995) sugirieron que WT1 está involucrado en la selección del linaje reprimiendo genes necesarios para la diferenciación de un linaje específico.

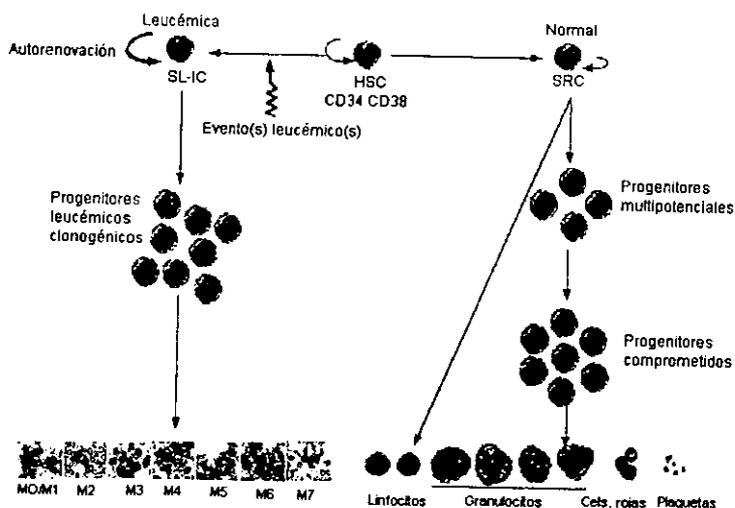


Figura 6. Posible punto de inicio para el proceso leucémico durante la hematopoyesis. La formación de células leucémicas sigue una vía similar a la formación de los diversos linajes hematopoyéticos normales.

Factores de crecimiento hematopoyético

Características como la sobrevivencia, diferenciación, proliferación y desarrollo de las células precursoras hematopoyéticas y la actividad funcional de las células sanguíneas maduras son influenciadas por los factores estimulantes de colonias (CSFs), las células mueren rápidamente por apoptosis en ausencia de los CSFs apropiados, de modo que, las células madre necesitan de la coestimulación por combinación de algunos factores para llevar a cabo sus funciones (Williams y col., 1990; Metcalf y Nicola, 1995).

En cultivos de médula ósea normal, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es un estímulo altamente selectivo para granulocitos neutrófilos, las células que responden a este factor son más maduras que las que responden a otros CSFs. Mientras que, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) actúa sobre un amplio rango de células, estimulando la proliferación y diferenciación de precursores mieloides y dando origen a granulocitos neutrófilos, eosinófilos y monocitos (Metcalf y Nicola, 1995).

Los CSFs en cultivos de células de LMA mantienen la viabilidad celular y retrasan la apoptosis. Aunque, muchas células leucémicas proliferan sin mostrar señales de diferenciación en respuesta a G-CSF, ya que son refractarias a la inducción para la diferenciación (Inoue y col., 1998).

ANTECEDENTES

Participación del gen WT1 en proliferación y diferenciación hematopoyética

Dentro del sistema hematopoyético la expresión de WT1 está limitada a las células hematopoyéticas más primitivas ($CD34^+CD33^-$) y disminuye conforme las células progenitoras se diferencian en células más maduras (Inoue y col., 1997). Es posible que la disminución de WT1 se asocie con el proceso de diferenciación en la hematopoyesis normal, ya que su expresión fue indetectable en células mononucleares $CD34^-$ (Baird y Simmons, 1997). Parece ser regulado de forma negativa cuando se induce la diferenciación de células en cultivo, lo cual apoya la idea de que WT1 se expresa a niveles más altos en células más inmaduras (Bergmann y col., 1997), específicamente antes de la determinación de la división mieloides/linfoides (King-Underwood y Pritchard-Jones, 1998).

El gen WT1 está altamente expresado en varios tipos de leucemias, como la mieloides crónica, linfoides aguda y la mieloblástica aguda, en esta última se sobreexpresa en el 40-70% de los pacientes, de los cuales una alta proporción corresponde a fenotipos indiferenciados (M1 y M2) de manera que llegó a considerarse como un marcador de blastos leucémicos (Baird y Simmons, 1997). Debido a que también se expresa en leucemias más maduras, se sugirió que su expresión está relacionada a la

En cultivos de médula ósea normal, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es un estímulo altamente selectivo para granulocitos neutrófilos, las células que responden a este factor son más maduras que las que responden a otros CSFs. Mientras que, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) actúa sobre un amplio rango de células, estimulando la proliferación y diferenciación de precursores mieloides y dando origen a granulocitos neutrófilos, eosinófilos y monocitos (Metcalf y Nicola, 1995).

Los CSFs en cultivos de células de LMA mantienen la viabilidad celular y retrasan la apoptosis. Aunque, muchas células leucémicas proliferan sin mostrar señales de diferenciación en respuesta a G-CSF, ya que son refractarias a la inducción para la diferenciación (Inoue y col., 1998).

ANTECEDENTES

Participación del gen WT1 en proliferación y diferenciación hematopoyética

Dentro del sistema hematopoyético la expresión de WT1 está limitada a las células hematopoyéticas más primitivas (CD34⁺CD33⁻) y disminuye conforme las células progenitoras se diferencian en células más maduras (Inoue y col., 1997). Es posible que la disminución de WT1 se asocie con el proceso de diferenciación en la hematopoyesis normal, ya que su expresión fue indetectable en células mononucleares CD34⁻ (Baird y Simmons, 1997). Parece ser regulado de forma negativa cuando se induce la diferenciación de células en cultivo, lo cual apoya la idea de que WT1 se expresa a niveles más altos en células más inmaduras (Bergmann y col., 1997), específicamente antes de la determinación de la división mieloide/linfoide (King-Underwood y Pritchard-Jones, 1998).

El gen WT1 está altamente expresado en varios tipos de leucemias, como la mieloide crónica, linfoide aguda y la mieloblástica aguda, en esta última se sobreexpresa en el 40-70% de los pacientes, de los cuales una alta proporción corresponde a fenotipos indiferenciados (M1 y M2) de manera que llegó a considerarse como un marcador de blastos leucémicos (Baird y Simmons, 1997). Debido a que también se expresa en leucemias más maduras, se sugirió que su expresión está relacionada a la

transformación maligna, más por su persistencia que por su sobreexpresión (Maurer y col., 1997). Inoue y col. (1994; 1996) demostraron que los pacientes con leucemia que expresan altos niveles del transcrito de WT1 tuvieron una mala respuesta al tratamiento y consecuentemente un mal pronóstico, por lo que sugirieron que los niveles de expresión están correlacionados inversamente con el pronóstico. Por lo anterior se creía que WT1 podía ser utilizado como un factor pronóstico y un nuevo marcador para el diagnóstico de enfermedad mínima residual en la leucemia. Schmid y col. (1997) no encontraron ninguna correlación entre los niveles de expresión del gen con la remisión completa o la supervivencia libre de la enfermedad, de lo que concluyeron que la determinación de la expresión al diagnóstico no tiene valor como factor pronóstico. Sin embargo, Lamaki y col. (1999), mostró que los niveles de expresión son un marcador para blastos preleucémicos o leucémicos en Síndromes mielodisplásicos, que podían reflejar la progresión de la enfermedad. Esto nos señala las discrepancias que aún existen en cuanto al conocimiento de la actividad y función del gen en el proceso leucémico.

Yamagami y col. (1996), por medio de experimentos con oligonucleótidos antisentido demostraron que la proteína wt1 era necesaria para permitir la proliferación continua y proteger de la apoptosis a las células leucémicas, implicando directamente a WT1 en la leucemogénesis.

Las causas de la sobreexpresión del gen WT1 en las células leucémicas aún no se han determinado, sin embargo, se demostró que un potenciador (enhancer) de WT1 es regulado por el factor de transcripción relacionado con eritrocitos/megacariocitos, GATA-1, aunque su expresión se limitó a una parte de la leucemia, mientras que la de WT1 fue general (Inoue y col., 1997).

En células HL60 la expresión del gen fue regulada de forma negativa durante la diferenciación granulocítica/monocítica (Sekiya y col., 1994), el mismo resultado se obtuvo cuando las células HL60 fueron tratadas con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), un inductor para la diferenciación en células semejantes a macrófagos (Deuel y col., 1999).

Svedberg y col., (1998) demostraron que la expresión constitutiva de WT1 en la línea de células leucémicas U937 llevó a la falta de respuesta a la inducción de la

diferenciación por el ácido retinoico o la vitamina D3 y que, el crecimiento y la viabilidad celular no se vieron afectados, por lo que es posible que estos procesos sean regulados de manera separada. Mientras que en la diferenciación de la línea K562 ocurrió algo diferente, la sobreexpresión constitutiva no alteró la diferenciación cuando las células fueron tratadas con TPA, de lo que Svedberg y col. (1999) concluyeron que la regulación negativa de WT1 no es un prerrequisito general para la maduración de las células hematopoyéticas.

Por otro lado, Smith y col., (1998) mostraron que después de la exposición de mieloblastos M1 al factor inhibidor de leucemia (LIF), se activó la expresión de WT1, la cual coincidió con la sobrerregulación del marcador de monocitos/macrófagos, *c-fms* y la aparición de monocitos maduros, aunque las células sólo expresaron las isoformas WT1+KTS. Esto demostró que las isoformas +KTS tienen el potencial para dirigir la expresión de genes específicos de linaje en la diferenciación de las células M1. Smith y col., (2000) demostró, también en células M1, que WT1 podía eliminar el crecimiento de células tumorales, particularmente la isoforma WT1-17aa+KTS. Recientemente, Ellinsen y col., (2001) proponen que durante la diferenciación de las células hematopoyéticas WT1 funciona como un supresor de tumores, de la misma manera que lo hace durante la diferenciación renal. Estos resultados son los primeros en demostrar su efecto de supresor en una línea leucémica, sugiriendo que la pérdida de la expresión funcional de WT1 es lo que contribuye a la leucemogénesis *in vivo*.

Su expresión constitutiva bloqueó la diferenciación e indujo la proliferación de las células precursoras de neutrófilos 32D cl3, al competir con la señal que induce a la diferenciación mediada por el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSFR), lo que llevó a un bloqueo de la diferenciación, pero no de la proliferación, al permitir únicamente la transducción de esta última señal. Este comportamiento se vio asociado con la alteración en la expresión de las proteínas Stat3 α y 3 β (Inoue y col., 1998).

Como pudo notarse, todas estas propuestas para definir las consecuencias de la expresión de WT1 en líneas celulares derivadas de leucemias han producido resultados conflictivos, debido a que en algunos casos se encontró proliferación celular aumentada pero inducción de arresto en el crecimiento en otros, y se propone tanto mediación como

inhibición de la diferenciación celular. Smith y col., (2000) y Ellisen y col., 2001, sugieren que éstas diferencias podrían deberse al tipo de células utilizadas en cada estudio.

Hasta ahora poco se conoce sobre la función particular de cada isoforma de WT1 en la hematopoyesis, debido a que después de los hallazgos de Smith y col., (1998; 2000), sólo Ellisen y col., (2001) ha sugerido una función para las isoformas +KTS y -KTS, su propuesta fue que WT1+KTS no dispara la diferenciación de células progenitoras por si sola, sino que tiene un efecto cooperativo al potenciar la diferenciación mediada por WT1-KTS, sin que aún se conozca el mecanismo por el cual ambas isoformas cooperan para inducir dicho proceso, ni cual es la participación de las isoformas +17aa/-17aa.

JUSTIFICACIÓN

Se señala que las diversas isoformas del gen WT1 pueden tener diferentes funciones dependiendo del tejido en el que se encuentren. En las leucemias la función de las isoformas aún no está bien establecida, debido a que los resultados han sido contradictorios, lo cual podría deberse a que el comportamiento de este gen se ha estudiado únicamente en cultivos de células derivadas de líneas celulares leucémicas y no directamente en cultivos de las células de pacientes con leucemia.

Por lo tanto nos proponemos identificar la(s) isoforma(s) presente(s) en las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺lin⁻ de individuos con leucemia, analizando las células después de ser cultivadas con factores de crecimiento hematopoyético. Este trabajo trata de hacer una aportación al conocimiento de la expresión del gen WT1 en células leucémicas obtenidas directamente de pacientes, como una propuesta más cercana a las condiciones *in vivo*, que no se observan en las células *in vitro* donde sólo se evalúa la función de una isoforma de manera independiente a las otras.

inhibición de la diferenciación celular. Smith y col., (2000) y Ellisen y col., 2001, sugieren que éstas diferencias podrían deberse al tipo de células utilizadas en cada estudio.

Hasta ahora poco se conoce sobre la función particular de cada isoforma de WT1 en la hematopoyesis, debido a que después de los hallazgos de Smith y col., (1998; 2000), sólo Ellisen y col., (2001) ha sugerido una función para las isoformas +KTS y -KTS, su propuesta fue que WT1+KTS no dispara la diferenciación de células progenitoras por si sola, sino que tiene un efecto cooperativo al potenciar la diferenciación mediada por WT1-KTS, sin que aún se conozca el mecanismo por el cual ambas isoformas cooperan para inducir dicho proceso, ni cual es la participación de las isoformas +17aa/-17aa.

JUSTIFICACIÓN

Se señala que las diversas isoformas del gen WT1 pueden tener diferentes funciones dependiendo del tejido en el que se encuentren. En las leucemias la función de las isoformas aún no está bien establecida, debido a que los resultados han sido contradictorios, lo cual podría deberse a que el comportamiento de este gen se ha estudiado únicamente en cultivos de células derivadas de líneas celulares leucémicas y no directamente en cultivos de las células de pacientes con leucemia.

Por lo tanto nos proponemos identificar la(s) isoforma(s) presente(s) en las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺lin⁻ de individuos con leucemia, analizando las células después de ser cultivadas con factores de crecimiento hematopoyético. Este trabajo trata de hacer una aportación al conocimiento de la expresión del gen WT1 en células leucémicas obtenidas directamente de pacientes, como una propuesta más cercana a las condiciones *in vivo*, que no se observan en las células *in vitro* donde sólo se evalúa la función de una isoforma de manera independiente a las otras.

HIPOTESIS

Debido a que los antecedentes sugieren que la expresión de WT1 es mas alta en células CD34⁺ leucémicas que en células CD34⁺ de médula ósea normal, se espera que el transcrito conocido más abundante WT1+17aa+KTS, sea predominante en las células leucémicas CD34⁺lin⁻, con respecto a las células CD34⁺lin⁻ de cordón umbilical.

Se ha demostrado en diversos modelos celulares que la expresión continua del transcrito del gen WT1, es uno de los factores que bloquean el proceso de diferenciación celular, por lo que se espera que después de que las células leucémicas sean estimuladas para diferenciarse, la presencia del transcrito de WT1 las mantenga en un estado indiferenciado.

OBJETIVOS

Generales:

Identificar y determinar las concentraciones relativas de la(s) isoforma(s) del RNAm de WT1 presentes en las células CD34⁺lin⁻ de pacientes con LMA antes y después de cultivarse con factores de crecimiento.

Analizar la respuesta de las células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻ al estímulo de diferenciación por los factores de crecimiento G-CSF y GM-CSF.

Particulares:

1. Identificar el tipo de isoforma del gen WT1 que se expresa en células CD34⁺lin⁻ de pacientes con leucemia mieloblástica aguda.
2. Determinar las concentraciones relativas de las isoformas del RNAm del gen WT1, en células CD34⁺lin⁻ de pacientes con leucemia mieloblástica aguda.
3. Determinar las concentraciones relativas de las isoformas del RNAm del gen WT1 en las células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻ después de 10 y 20 días de cultivo con los factores de crecimiento G-CSF y GM-CSF.
4. Verificar el grado de diferenciación de las células mantenidas en cultivo durante 10 y 20 días con G-CSF y GM-CSF.

HIPOTESIS

Debido a que los antecedentes sugieren que la expresión de WT1 es mas alta en células CD34⁺ leucémicas que en células CD34⁺ de médula ósea normal, se espera que el transcrito conocido más abundante WT1+17aa+KTS, sea predominante en las células leucémicas CD34⁺lin⁻, con respecto a las células CD34⁺lin⁻ de cordón umbilical.

Se ha demostrado en diversos modelos celulares que la expresión continua del transcrito del gen WT1, es uno de los factores que bloquean el proceso de diferenciación celular, por lo que se espera que después de que las células leucémicas sean estimuladas para diferenciarse, la presencia del transcrito de WT1 las mantenga en un estado indiferenciado.

OBJETIVOS

Generales:

Identificar y determinar las concentraciones relativas de la(s) isoforma(s) del RNAm de WT1 presentes en las células CD34⁺lin⁻ de pacientes con LMA antes y después de cultivarse con factores de crecimiento.

Analizar la respuesta de las células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻ al estímulo de diferenciación por los factores de crecimiento G-CSF y GM-CSF.

Particulares:

1. Identificar el tipo de isoforma del gen WT1 que se expresa en células CD34⁺lin⁻ de pacientes con leucemia mieloblástica aguda.
2. Determinar las concentraciones relativas de las isoformas del RNAm del gen WT1, en células CD34⁺lin⁻ de pacientes con leucemia mieloblástica aguda.
3. Determinar las concentraciones relativas de las isoformas del RNAm del gen WT1 en las células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻ después de 10 y 20 días de cultivo con los factores de crecimiento G-CSF y GM-CSF.
4. Verificar el grado de diferenciación de las células mantenidas en cultivo durante 10 y 20 días con G-CSF y GM-CSF.

METODOS

Muestras biológicas:

Las células leucémicas se obtuvieron de aspirados de médula ósea de once pacientes adultos con LMA sin tratamiento previo y fueron donadas por el Laboratorio de Hematopoyesis de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del CMN SXXI.

Purificación de células CD34⁺lin⁻

La separación de las células fue llevada a cabo en el Laboratorio de Hematopoyesis de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. Se utilizó una columna inmunomagnética con el sistema de separación negativa, donde las células deseadas pasan por una columna, mientras que, las que permanecen adheridas son las que se desea eliminar. La ventaja de esta técnica es que las células de interés no quedan marcadas con anticuerpos, por lo que no se altera su fisiología.

La purificación de las células progenitoras se realizó de acuerdo al protocolo de StemCell Technologies Inc. Se obtuvieron las células mononucleares (CMN) mediante un gradiente de Ficoll. Una vez obtenidas las CMN se llevaron a una concentración de 100×10^6 cel/ml, con un rango de 20 a 150×10^6 cel/ml, diluyéndolas con Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) + 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB).

Las células fueron marcadas con un anticuerpo tetramérico (dos anticuerpos monoclonales murinos IgG₁ mantenidos en un arreglo tetramérico por dos anticuerpos monoclonales de rata anti-ratón IgG₁) agregando 100 μ l de la mezcla de anticuerpos específicos de linaje (CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b, CD41, glicoforina A, mezcla establecida por StemCell Technologies, Vancouver, Canada), por cada mililitro de células ($50-100 \times 10^6$ células) mezclando homogéneamente. Se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

Se agregaron 60 μ l de suspensión coloidal de partículas magnéticas de hierro-dextrán, por mililitro de células y se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

Se llenó una columna magnética con PBS sin suero, se agregó lentamente teniendo cuidado de que no entraran burbujas. A continuación se agregó PBS con 10%

de SFB. Cuidando que la columna no se secase y se lavó hasta haber recolectado 8 ml en un tubo.

Se cambió el tubo recolector por uno nuevo estéril para recolectar la muestra. Se agregó la muestra y cuando comenzó a caer se agregó PBS con 10% de FBS y se dejó correr hasta que se recolectaron 10 ml.

Finalmente la muestra se centrifugó a 1200 rpm durante 7 minutos, se obtuvo la pastilla y se resuspendió en 500-1000 μ l de medio de cultivo para su cuenta en una cámara de Neubauer y uso posterior.

Cultivo de las células CD34⁺lin⁻ con factores de crecimiento

Las células hematopoyéticas fueron cultivadas en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) suplementado con SFB (15% v/v) a una concentración celular de 2×10^5 /ml. Los cultivos se realizaron en presencia (identificado como G+GM) o ausencia (identificado como control) de las citocinas recombinantes: Factor estimulante de colonias de granulocitos y factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (G-CSF y GM-CSF) a una concentración de 10 y 20 ng/ml respectivamente.

Se evaluó el número total de células leucémicas a los días 10 y 20 de cultivo, período ubicado dentro del tiempo óptimo para la proliferación de estas células (Mayani et al., 1991). Las células fueron cuantificadas en una cámara de Neubauer, se verificó el tipo de células precursoras y células maduras, a través del análisis morfológico en frotis teñidos con Wright-Giemsa. Las células obtenidas de cordón umbilical fueron cultivadas por 7 y 14 días de acuerdo a condiciones óptimas para su cultivo, previamente establecidas.

Aislamiento de RNA total.

El RNA total de las muestras analizadas se obtuvo siguiendo el método descrito por Chomczynski (1987). Las células CD34⁺lin⁻ fueron lisadas con 200 μ l de trizol (Gibco, BRL) por cada 5×10^5 células y se agregaron 40 μ l de cloroformo agitándose fuertemente el tubo e incubándose a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 4°C. El RNA presente en la fase acuosa se precipitó con 1 volumen de isopropanol frío, se centrifugó y lavó con etanol al 75%. Finalmente se secó y se

resuspendió en agua tratada con dietilpírocarbonato y se almacenó a -70°C hasta el momento de ser analizado.

El grado de pureza y la concentración del RNA se determinó por espectrofotometría. En una cedula de cuarzo se resuspendió la solución de RNA problema y se determinó la absorbancia a 260 y 280 nanómetros en un espectrofotómetro Perkin Elmer MBA 2000. Considerando que una densidad óptica de RNA unicatenario es igual a $40\ \mu\text{g/ml}$, se calculó la concentración del RNA problema. Para establecer el grado de pureza de la solución de RNA se determinó el cociente 260/280.

La integridad del RNA se determinó corriendo una alícuota en un gel horizontal de agarosa al 2% a 50 volts durante 2 horas, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio para visualizar el RNA en un transiluminador con luz UV.

Determinación del transcrito del gen WT1, mediante RT-PCR.

La RT-PCR se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Kawasaki (1991), utilizando el Kit de RT-PCR AMV (Boheringer). Con alícuotas de $1\ \mu\text{g}$ de RNA total se sintetizó la primera cadena de cDNA. La reacción se llevó a cabo con solución amortiguadora 1X (Tris-HCl pH 8.3 100 mM, KCl 500 mM) 1mM de cada dNTP, 5mM de MgCl_2 , 3mM de oligo dT, 50 U de inhibidor de RNAsas, 20 U de transcriptasa reversa en un volumen final de $25\ \mu\text{l}$. Se incluyó un control sin RT para descartar la presencia de DNA genómico.

El producto de la síntesis de la primera cadena de cDNA se usó para producir la segunda cadena mediante PCR. Se utilizaron 20 pmol de dos pares de oligonucleótidos en la misma reacción, uno para amplificar una región del RNAm del gen WT1, ya sea el exón 5: 5'-GGA ATC AGA TGA ACT TAG GAG-3' (sentido), 5'-GTG CGT GTG TAT TCT GTA TTG -3' (antisentido), ó el exón 9: 5'-CCA GTC CAA AAG ACA CCA AAG-3' (sentido), 5'-CAA ACT TTT TCT GAC AAC TTG G -3' (antisentido), (modificados de Haber et al, 1991) y otro para amplificar una región del RNAm del gen para β -actina como control interno: 5'-AGC AAG AGA GGC ATC CTC ACC-3' (sentido), 5'-CTA CCT TCA ACT CCA TCA TGA AC-3' (antisentido). Se incluyó un control con ddH₂O en lugar

de cDNA, para verificar ausencia de contaminación y un control positivo normal con cDNA derivado de células de sangre de cordón umbilical. Cuando fue posible se incluyó un control propio de la muestra, utilizando células mononucleares.

La síntesis de la segunda cadena se hizo mediante la amplificación del cDNA utilizando 2 μ Ci del isótopo α - 32 P-dCTP y 0.02 pmol de dCTP frío, de la siguiente manera: Una desnaturalización inicial del cDNA a 94°C por 5 minutos, se realizaron 30 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 60 segundos, seguida por una reacción de alineación por 60 segundos a 55°C y una extensión a 72°C por 60 segundos. Con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Determinación semicuantitativa de los transcritos del gen WT1

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida no desnaturalizante al 8%, durante 4 horas a 300 volts. El gel se secó con vacío a 80°C y se expuso a una placa autoradiográfica (Kodak Ektascan EM-1) en un cassette de 1 a 17 horas. El análisis de la autoradiografía y la determinación semicuantitativa de las isoformas del gen WT1, se realizó comparando las intensidades de las bandas de las isoformas con respecto a la banda que corresponde al transcrito del gen "housekeeping" β -actina, utilizando el sistema de computo IS-1000 Digital Imaging System. Este sistema permitió la cuantificación de los niveles relativos de los cuatro transcritos en cada muestra. Se utilizó la fórmula $X = B \times 100/A$, donde X = % isoforma, B = valor asignado por el programa para la isoforma, 100 = % para β -actina, A = valor asignado por el programa para β -actina.

Para calcular si existía diferencia significativa en la expresión de las isoformas entre las células leucémicas y las células normales de cordón se utilizó la prueba estadística no paramétrica de U de Mann-Whitney.

Extracción de fragmentos en gel de poliacrilamida

Para extraer los fragmentos del gel de poliacrilamida se utilizó el kit de QIAGEN®. Se cortaron las secciones que contenían las bandas esperadas, minimizando el tamaño de éstas para remover el exceso de poliacrilamida. Los fragmentos fueron pesados, mezclados con 2 volúmenes de amortiguador de difusión (100-200 μ l por cada 100 μ g de gel) y pasados por una jeringa.

La mezcla se incubó a 50°C durante 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm un minuto y se retiró cuidadosamente el sobrenadante, el cual fue pasado por un tubo ependorff con fibra de vidrio para eliminar cualquier residuo de poliacrilamida. Luego de calcular el volumen del sobrenadante se le agregaron 6 volúmenes de amortiguador QX1 y 10 μ l de QIAEX II (previamente resuspendido en vortex durante 30 segundos), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente 10 minutos (agitando con el vortex cada 2 minutos para mantener las partículas QIAEX II en suspensión). La mezcla se centrifugó 30 segundos y se eliminó el sobrenadante.

La pastilla se lavó 2 veces con 500 μ l de amortiguador PE (QIAGEN, Inc.). Se secó la pastilla por 15 minutos sin utilizar vacío. Para eluir el DNA se agregaron 20 μ l de H₂O pH 7.5 y se resuspendió en vortex, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13000 rpm 30 segundos, se transfirió a un tubo limpio y se almacenó a -20°C.

Cuantificación de los productos purificados

El reactivo para cuantificación de DNA de doble cadena en solución, PicoGreen (PicoGreen® Molecular Probes, EUA), es una tinción fluorescente ultrasensible para ácidos nucleicos y permite cuantificar hasta 25 pg/ml de DNA de doble cadena.

Se utilizaron 100 μ l de una dilución 1:200 de la solución de PicoGreen concentrada en Dimetil sulfóxido (DMSO), ésta dilución se preparó con amortiguador TE [Tris-Cl (pH 7.4)-EDTA (pH 8)] 1X, 100 μ l de amortiguador TE, 0, 0.5, 1 y 2 μ l de DNA para la curva de calibración y 2 μ l de DNA muestra. La fluorescencia fue medida en el lector de microplacas Fluoroskan Ascent FL (Labsystems) y analizada con el programa Ascent Versión 2.4.1. Finalmente los datos fueron interpretados en una hoja de cálculo.

Secuenciación

Se empleó el kit DyeDeoxy™ Terminator (PE-Biosystem, EUA), donde los terminadores reemplazan a los deoxinucleótidos normales en el secuenciamiento enzimático, incorporando una marca de colorante en el DNA junto con la base terminadora. Esto elimina de manera química falsos "stops" marcados y las cuatro reacciones de terminación se realizan en un solo tubo, reduciendo la manipulación.

Se utilizaron 2µl de DyeDeoxy Terminator, 2µl de la dilución de DNA muestra (con una concentración final de 2ng), 10 pmol del oligonucleótido sentido y agua destilada para un volumen final de 20µl. La reacción de PCR se realizó con las condiciones antes señaladas.

El producto de la reacción fue purificado en columnas Centri-Sep (Princeton Separations Inc.), apropiadas para eliminar el exceso de los terminadores en la reacción de secuenciación. Todo el producto de la reacción se puso en la columna (previamente hidratada por 2 horas con 800µl de agua destilada y centrifugada a 3000 rpm por 3 minutos para eliminar el exceso de agua) cuidando que no se perdiera la muestra por las paredes ni tocando el centro con la pipeta, se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos, la muestra recuperada se secó con vacío por 2-3 horas sin calor.

La muestra seca se disolvió en una mezcla de formamida, Tetraacetato de etilendiamina (EDTA) 25 mM pH 8.0 y azul dextrán. Posteriormente se corrieron en un secuenciador de DNA ABI PRISM™ 377 (Perkin Elmer), en un gel desnaturizante al 4.75%, en amortiguador TBE 1X, durante 7 horas. La señal emitida por los terminadores al ser excitados por el láser fue capturada con el programa Data Collection y analizada con el programa Sequencing Análisis.

RESULTADOS

Identificación de las isoformas de WT1 presentes en células CD34⁺lin⁻ de pacientes con LMA.

En este estudio se analizaron 11 aspirados de médula ósea de personas con leucemia mieloblástica aguda sin tratamiento previo. En la Tabla 1 se señalan las características generales de los pacientes estudiados.

Tabla 1. Relación de las características generales de los pacientes.

PACIENTE	SEXO	EDAD (años)	TIPO LMA	CARIOTIPO*
1	M	39	M0	Nd
2	F	32	M2	46, XX
3	M	Nd	M2	Nd
4	F	Nd	M4	Nd
5	M	18	M2	45, XY, t(8;21)
6	M	Nd	M4	Nd
7	F	26	M4	46, XX, +Inv 16; +delec 17
8	F	56	M2	46, XX, -8 -21, + 8, +t(8;21)
9	F	Nd	M2	46, XX
10	F	34	M4	Nd
11	F	51	M3	Nd

Nd No determinado.

*El cariotipo fue realizado en el Departamento de Genética del Hospital General, SSA.

De las muestras trabajadas se obtuvieron los RNAs totales. Como control positivo normal se analizaron 5 muestras de células sanguíneas de cordón umbilical. La muestra No 5 de células de cordón resultó abundante, de manera que fue posible cultivarla con factores de crecimiento hematopoyético para comparar su expresión de WT1 con aquélla de las células leucémicas cultivadas en presencia de los factores G-CSF y GM-CSF.

Las concentraciones de los RNAs obtenidos de los diferentes tipos celulares presentaron una variación de 20 hasta 1000 ng/ μ l, las células de cordón umbilical presentaron las concentraciones más bajas. Todos los RNAs mostraron una integridad adecuada para su análisis (Figura 7).

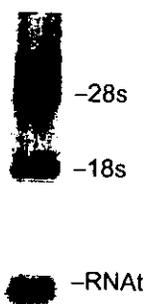


Figura 7. Integridad de los RNAs obtenidos de las células $CD34^+lin^-$. Las bandas corresponden a los RNAs ribosomales de 28s, 18s y RNAs de transferencia.

Los oligonucleótidos utilizados permitieron detectar cuatro bandas, dos bandas para cada exón. Se identificó la presencia de las cuatro isoformas generadas por el procesamiento alternativo de los exones 5 y 9, del gen WT1 en células $CD34^+lin^-$. La identificación de las isoformas se hizo de manera independiente una de otra, de modo que las isoformas encontradas fueron: WT1+17aa, WT1-17aa, WT1+KTS, WT1-KTS (Figura 8).

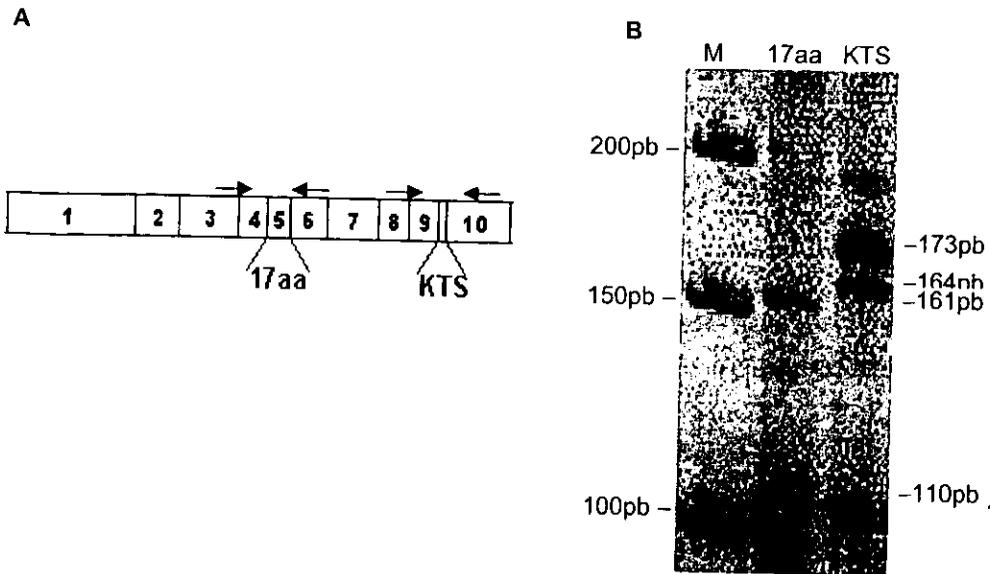


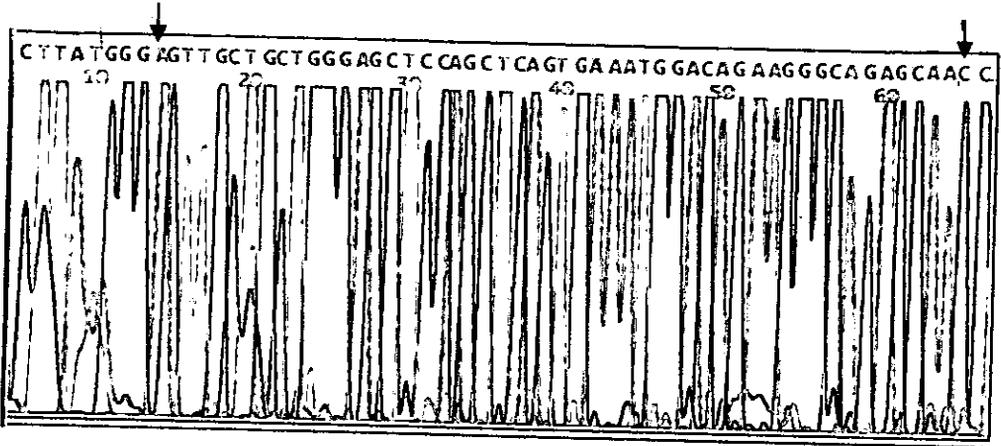
Figura 8. Isoformas de WT1 generadas por el procesamiento alternativo. A) Representación esquemática del RNAm de WT1 donde se muestran las posiciones de los oligonucleótidos en los dos sitios de corte y unión alternativos. B) Electroforesis en gel de poliacrilamida donde se observan las cuatro bandas que corresponden a +17aa (161pb), -17aa (110pb), +KTS (173pb) y -KTS (164pb). M: Marcador de peso molecular, 17aa: isoformas del exón 5, KTS: isoformas del exón 9.

En las células CD34⁺lin⁻ de cordón umbilical se observó un comportamiento similar a lo encontrado en las células leucémicas, localizando las 4 bandas antes mencionadas, sin embargo en el cordón No 1 no se pudo diferenciar la banda correspondiente a -KTS.

La identidad de las 4 isoformas obtenidas se confirmó por secuenciación automática. Los 4 cDNAs obtenidos correspondieron con lo esperado. La secuencia correspondiente al exón 5 se encuentra señalada en negro, mientras que en gris se señalan, hacia el extremo 5' las últimas 5 bases del exón 4 y hacia el extremo 3' las primeras 5 bases del exón 6 (Figura 9). Para la inserción KTS, la secuencia también se señala con negro y con gris las 5 bases finales del exón 8 y las 5 bases iniciales del exón 10 (Figura 10).

A

5'...ATGGGAGTTGCTGCTGGGAGCTCCAGCTCAGTGAATGGACAGAAGGGCAGAGCAACCCAC...3'



B

5'...ATGGGCCAC...3'

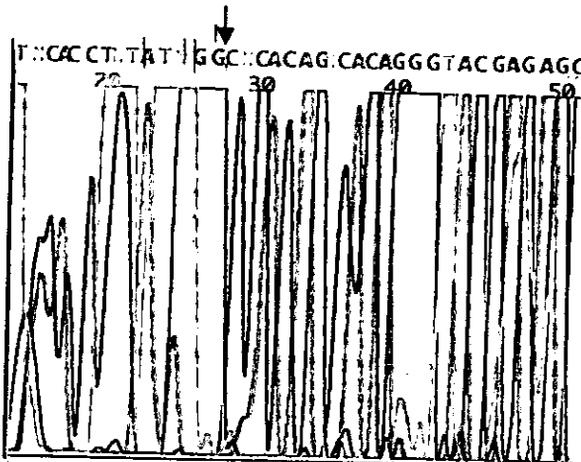
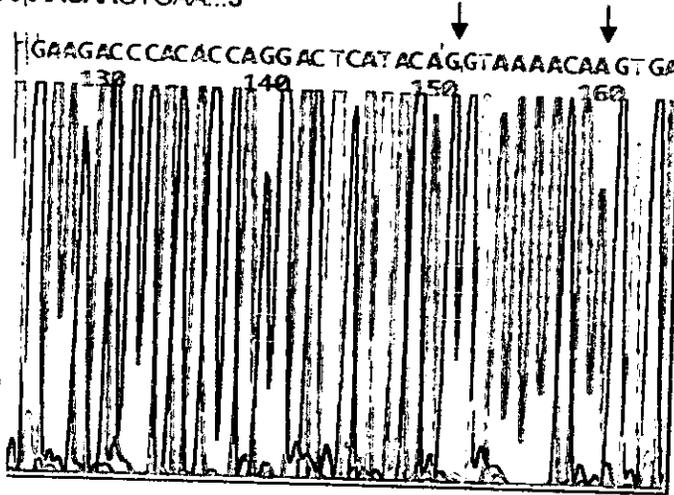


Figura 9. Secuencia del exón 5, las flechas señalan el tamaño de 17aa con 51pb abarcando la totalidad del exón (A), mientras que en (B), la flecha señala el punto donde ocurre la eliminación del exón 5 entre los exones 4 y 6 señalados en letras grises.

A

5'...TACAGGTAAAACAAGTGAA...3'



B

5'... TACAGGTGAA...3'

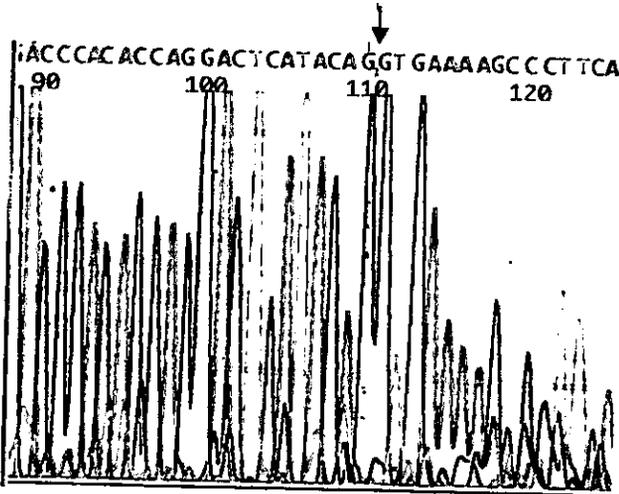


Figura 10. A) Secuencia del extremo del exón 9, donde se codifican los 9pb de KTS, señalados entre dos flechas y B) Ausencia de KTS entre los exones 9 y 10 señalada por la flecha.

Determinación de las concentraciones relativas de las isoformas del RNAm de WT1.

El análisis semicuantitativo de las muestras permitió comparar el nivel de expresión del gen "housekeeping" β -actina con el nivel de las isoformas. Empleando el Programa IS1000 se analizó la densidad de las bandas en la autorradiografía, densidad que es convertida en un porcentaje numérico. De los valores obtenidos la banda correspondiente a β -actina se consideró como el 100% (Figura 11).

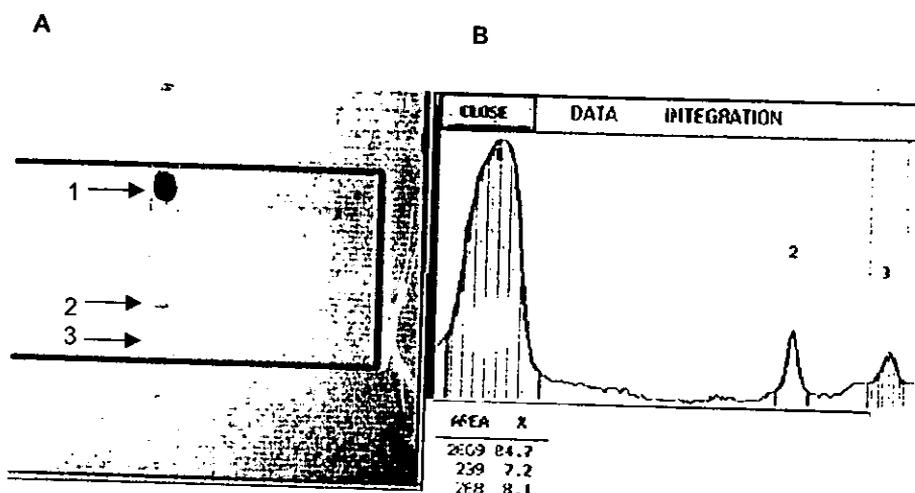


Figura 11. Imagen obtenida con el programa IS1000. (A) Se analizó la densidad de las bandas en la autorradiografía, la banda más intensa corresponde a β -actina, mientras que las bandas que se observan en la parte inferior corresponden a las dos isoformas. (B) A partir del pico generado por cada banda es posible analizar su densidad y calcular una proporción numérica en porcentaje. 1: β -actina, 2: Isoforma con inserción, 3: Isoforma sin inserción.

Se encontró que la expresión del gen WT1 fue mayor en las muestras de leucemia en comparación con la expresión en células de sangre de cordón umbilical. La prueba estadística no paramétrica de *U* de Mann-Whitney (Maurer y col., 1997), señaló que la proporción de WT1 en las células leucémicas con respecto a las células de sangre de cordón umbilical fue mayor para todas las isoformas.

Isoformas 17aa: n=9, +17aa: U_O=8, U_T=1; -17aa: U_O=6, U_T=1.

Isoformas KTS: n=11, +KTS: U_T=1, U=8; -KTS: U_T=0, U=4. El nivel de significación para las cuatro isoformas fue P=0.05.

Aún cuando los sitios de procesamiento alternativo fueron identificados de manera independiente, fue posible establecer que la isoforma con mayor expresión en ambos tipos celulares fue WT1+17aa+KTS y la menos abundante, la que carece de ambas inserciones, este resultado se confirmó amplificando un fragmento que incluyó ambos exones (Figura 12).

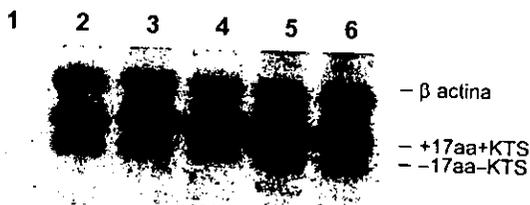


Figura 12. Amplificación de un fragmento que abarca tanto al exón 5 como al 9, se observa en todos los casos que WT1+17aa+KTS es la isoforma más abundante. 1) Control sin cDNA, 2) Células CD34⁺lin⁻ día 0, 3) CMN día 0, 4) Células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻ 10 días después de ser cultivadas sin factores de crecimiento hematopoyético, 5) Células MN 10 días después de ser mantenidas en cultivo sin factores de crecimiento hematopoyético, 6) CMN cultivadas con factores de crecimiento hematopoyético por 20 días.

La relación entre las isoformas fue la esperada, es decir, en todos los casos las isoformas con la inserción se expresaron más que las isoformas que carecen de ella, aunque la relación fue muy variable, desde 1.1:1 hasta 4.6:1 para las isoformas +17aa/-17aa y de 1.1:1 a 10:1 para las isoformas +KTS/-KTS. No existió variación en la presencia de la isoforma +17aa entre las células leucémicas y las normales (x= 2.4:1, en ambos casos). Sin embargo, la presencia de la isoforma +KTS fue mayor en las células leucémicas. En las CMN hubo mayor expresión de las isoformas con la inserción (Haber y col., 1991) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje y relación de las isoformas WT1+17aa/-17aa, +KTS/-KTS en células leucémicas y de cordón umbilical.

PACIENTE	SUBTIPO LMA	+17aa/-17aa	*RELACION	+KTS/-KTS	*RELACION
1	LMA-M0	9.7% / 7.6%	1.3:1	9.7%/7.3%	1.3:1
2	LMA-M2	51.9% / 15.02%	3.4:1	38.7%/10.9%	3.5:1
3	LMA-M2	Nd	Nd	32.2%/17.16%	1.9:1
4	LMA-M4	Nd	Nd	56.6%/43.4%	1.3:1
5	LMA-M2	38.7%/8.3%	4.6:1	68.2%/6.5%	10:1
6	LMA-M4	49.8%/38.2%	1.3:1	37%/13%	2.8:1
7	LMA-M4	55.9%/16.7%	3.3:1	42.5%/20.5%	2.1:1
8	LMA-M2	68.7%/31.6%	2.2:1	19.8%/11.4%	1.7:1
9	LMA-M2	CD34* 40%/20.7%	1.9:1	CD34* 52%/16%	3.2:1
		MN 26.3%/6.5%	4:1	MN 69.3%/20%	3.4:1
10	LMA-M4	CD34* 37% / 37.5%	1:1	CD34* 66.3/19.2%	3.4:1
		MN 22%/ 21.3%	1:1	MN 55.5%/ 19.5%	2.8:1
11	LMA-M3	CD34* 40.4% / 13%	3.1:1	CD34*59.5%/30%	2:1
		MN 44% / 18%	2.4:1	MN 76.5% / 28%	2.7:1
PROMEDIO		CD34* x= 43.5%/ 21% MN x= 30.7% / 15.2%	x= 2.4:1	CD34* x=43.8%/17.7% MN x=67%/22.5%	x= 3:1
CORDÓN UMBILICAL		+17aa/-17aa	*RELACION	+KTS/-KTS	*RELACION
1		CD34*			
		55.2%/18.8%	3:1	CD34+ 53.8%	•
2		CD34* 10.9%/7.9%	1.4:1		
		MN 7.1%/2.2%	3.2:1	Nd	Nd
3		MN 8.6%/2.2%	4:1	Nd	Nd
4		MN 9.7%/8.2%	1.1:1	MN 27.3%/21.2%	1.3:1
5		MN 7.7%/3%	2.6:1	CD34*	
		CD34* x= 33%/ 13.3%		13%/11.5%	1.1:1
PROMEDIO		CD34* x= 33%/ 13.3% MN x= 8.3% / 4%	x= 2.4:1	CD34* x= 33.4%	x= 1.2:1

Nd No determinado. • Sólo una isoforma. * La relación se obtuvo al dividir el % de la isoforma presente entre el % de la isoforma ausente

Determinación de las concentraciones de las isoformas del RNAm de WT1 en las células derivadas en cultivo, a partir del linaje CD34⁺lin⁻.

La proporción en la expresión de las isoformas en las células descendientes del linaje CD34⁺lin⁻ en presencia de los factores de crecimiento hematopoyético fue variable. En el paciente 8 se encontró una disminución en la expresión de +17aa-17aa al día 10 de cultivo y un aumento a los 20 días de cultivo, mientras que las isoformas de KTS mostraron un incremento en su expresión a lo largo del cultivo (Figura 13) (Tabla 4).

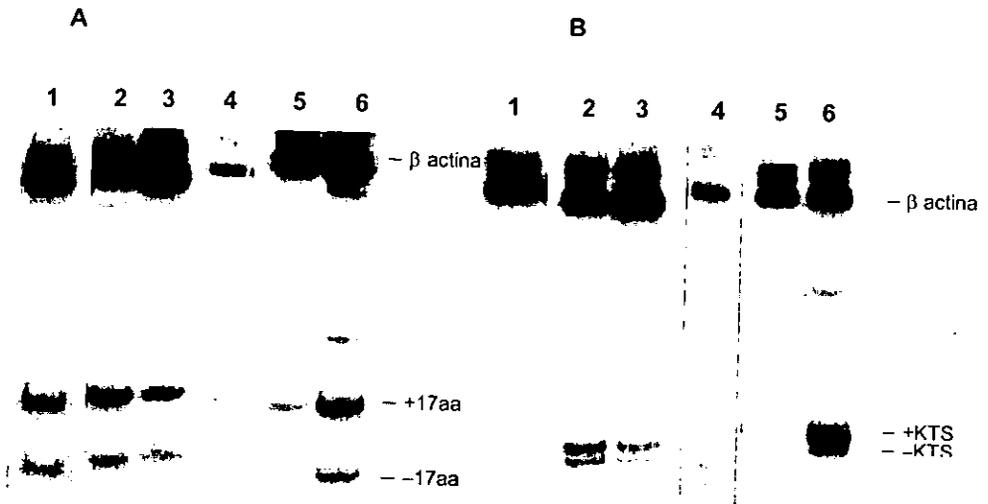
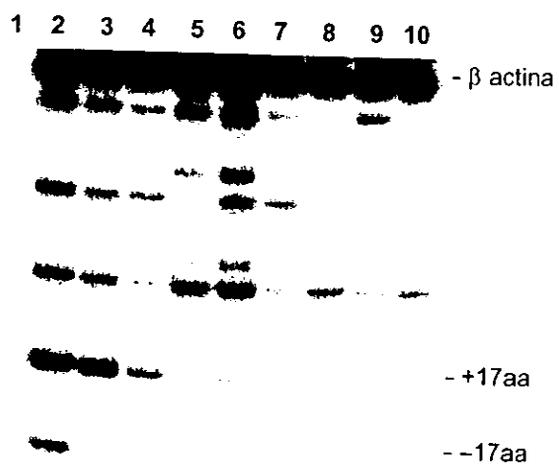


Figura 13. Variaciones observadas en la expresión de las diferentes isoformas en las células cultivadas por 10 y 20 días con G-CSF y GM-CSF del paciente 8. Se observa una proporción alta, que disminuye para el día 10 y se eleva nuevamente en el día 20 de cultivo. En A se encuentran las isoformas +17aa/-17aa y en B +KTS/-KTS. 1) Control normal de sangre de cordón umbilical, 2) Células CD34⁺lin⁻ día 0, 3) Control de células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻ al día 10 de cultivo, 4) Células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻ 10 días después de ser cultivadas con factores de crecimiento hematopoyético, 5) Control de células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻ 20 días después de ser mantenidas en cultivo sin factores de crecimiento hematopoyético, 6) Células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻ cultivadas con factores de crecimiento hematopoyético por 20 días.

En el paciente 9 se observó una disminución gradual desde el día 0 hasta el día 20 en ambas isoformas (Figura 14). Las CMN del paciente 9 mostraron diferente comportamiento en la expresión de las isoformas, debido a que, para las isoformas del exón 5 los niveles de expresión fueron menores que en las células procedentes del linaje CD34⁺lin⁻, mientras que, para las isoformas del exón 9 las CMN presentaron una mayor expresión de KTS que lo observado en las células derivadas del linaje CD34⁺lin⁻, excepto a los 10 días de cultivo con factores de crecimiento, donde las células procedentes del linaje CD34⁺lin⁻ del cultivo con factores presentaron una mayor expresión de KTS.

A



B

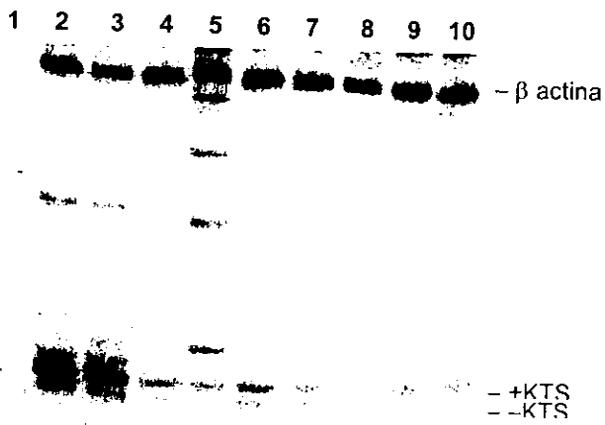


Figura 14. Expresión de las diferentes isoformas en las células cultivadas por 10 y 20 días con G-CSF y GM-CSF del paciente 9. Se observa la disminución gradual en la expresión de las isoformas a través del tiempo de cultivo. En A se presentan las isoformas $\pm 17aa$ y en B las isoformas $\pm KTS$. 1) Control sin cDNA, 2) $CD34^+lin^-$ día 0, 3) Control interno de CMN día 0, 4) Control sin factores de crecimiento hematopoyético de células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ a los 10 días de cultivo, 5) Control interno de CMN a los 10 días de cultivo sin factores de crecimiento hematopoyético, 6) Células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ 10 días después de ser cultivadas con los factores G-CSF, GM-CSF, 7) Control interno de CMN 10 días después de ser cultivadas con los factores de crecimiento hematopoyético, 8) Control de células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ 20 días después de ser cultivadas, 9) Control interno de CMN a los 20 días de cultivo sin factores de crecimiento hematopoyético, 10) Células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ a los 20 días de cultivo con factores. Por falta de células no se cultivaron CMN con factores de crecimiento hematopoyético por 20 días.

En el caso del paciente 10 la expresión de las isoformas disminuyó al día 10, debido a la falta de células $CD34^+$ en el día 20 no se determinó su comportamiento, sin embargo, la tendencia del control y de las CMN fue aumentar al final del periodo de cultivo (Figura 15). Mientras que en el paciente 11 la expresión de WT1 en ambos tipos celulares, aumentó al día 10 y disminuyó al día 20 (Figura 16).

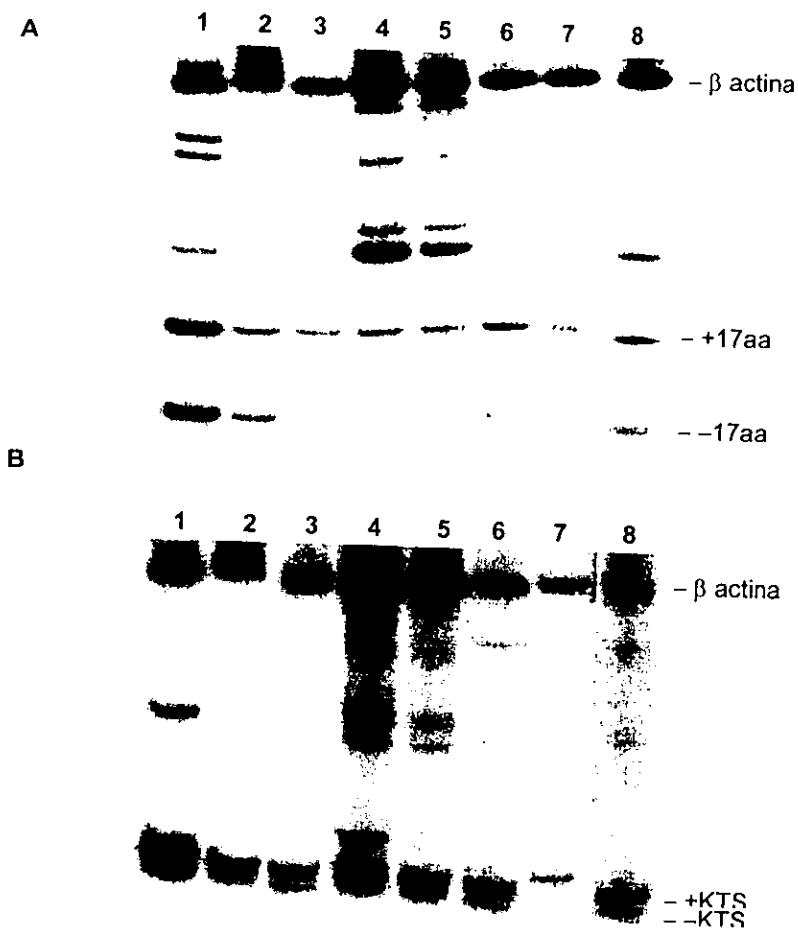


Figura 15. Expresión de las diferentes isoformas en las células cultivadas por 10 y 20 días con G-CSF y GM-CSF del paciente 10. En A se presentan las isoformas $\pm 17aa$ y en B las isoformas $\pm KTS$. 1) $CD34^+lin^-$ día 0, 2) Control interno de CMN día 0, 3) Control de células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ sin factores de crecimiento hematopoyético a los 10 días de cultivo, 4) Células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ 10 días después de ser cultivadas con los factores G-CSF, GM-CSF, 5) Control interno de CMN 10 días después de ser cultivadas con los factores de crecimiento hematopoyético, 6) Control de células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$, 20 días después de ser cultivadas sin factores de crecimiento, 7) Control interno de CMN a los 20 días de cultivo sin factores de crecimiento hematopoyético, 8) Células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ a los 20 días de cultivo con factores.

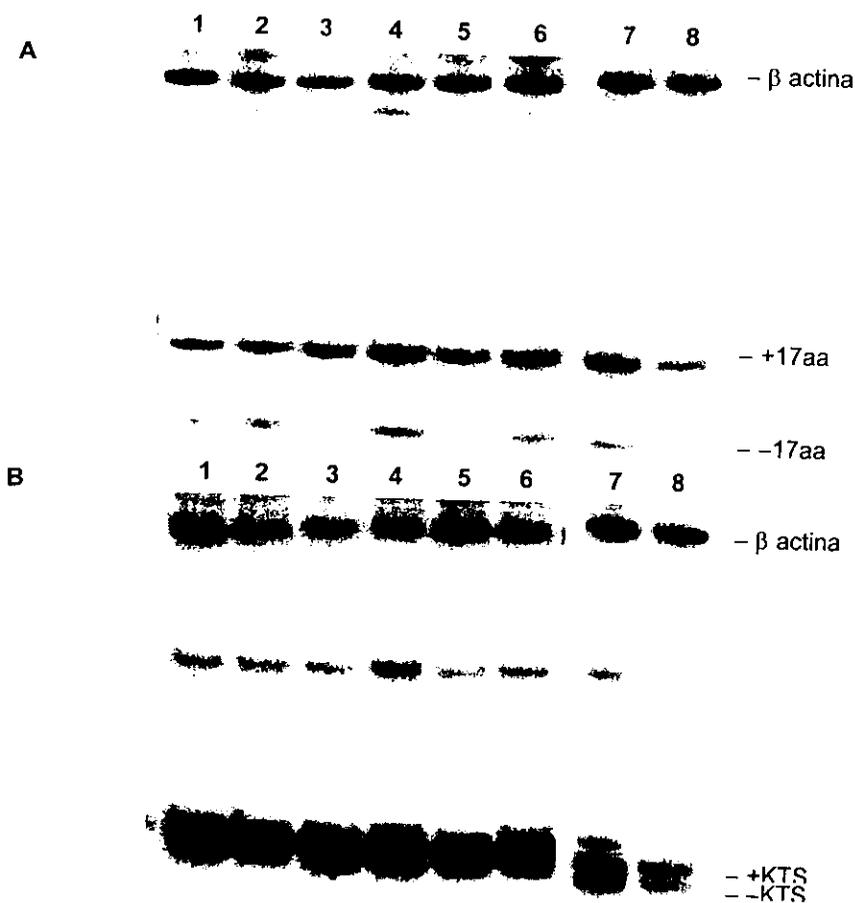


Figura 16. Expresión de las diferentes isoformas en las células cultivadas por 10 y 20 días con G-CSF y GM-CSF del paciente 11. En A se presentan las isoformas $\pm 17aa$ y en B las isoformas $\pm KTS$. 1) $CD34^+lin^-$ día 0, 2) Control interno de CMN día 0, 3) Control de células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ sin factores de crecimiento hematopoyético a los 10 días de cultivo, 4) Células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ 10 días después de ser cultivadas con los factores G-CSF, GM-CSF, 5) Control interno de CMN 10 días después de ser cultivadas con los factores de crecimiento hematopoyético, 6) Control de células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$, 20 días después de ser cultivadas sin factores de crecimiento, 7) Control interno de CMN a los 20 días de cultivo sin factores de crecimiento hematopoyético, 8) Células derivadas del linaje $CD34^+lin^-$ a los 20 días de cultivo con factores.

Debido a la baja sobrevivencia de las células de cordón umbilical sólo fue posible mantener una muestra a través del periodo de cultivo. En éstas células normales se observó algo diferente a lo encontrado en las células leucémicas, ya que la expresión de las isoformas fue de menor a mayor proporción, a través del periodo de cultivo, además presentaron baja expresión de RNAm (Figura 17) (Tablas 3 y 4).

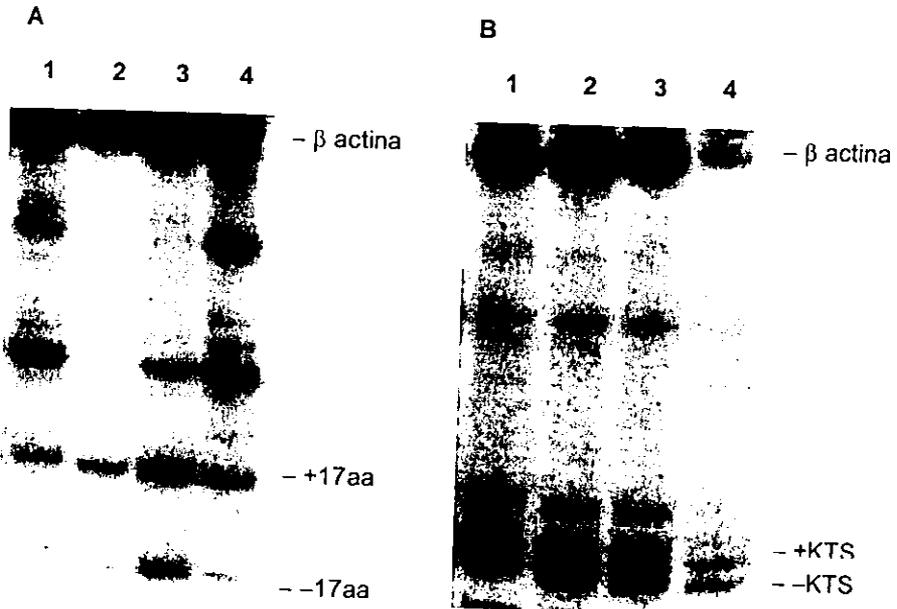


Figura 17. Expresión de las isoformas de WT1 en células mononucleares normales de cordón umbilical después de ser cultivadas con factores de crecimiento por 14 días. En A se encuentran las isoformas 17aa y en B las isoformas de KTS. 1) CMN al día 0, 2) Control de células CMN al día 7 de cultivo sin factores, 3) CMN después de 7 días de cultivo con factores de crecimiento, 4) CMN después de 14 días de ser cultivadas con los factores G-CSF, GM-CSF.

Tabla 3. Porcentajes de las isoformas WT1+17aa y WT1-17aa durante el periodo de cultivo con factores de crecimiento hematopoyético.

PACIENTE	SUBTIPO LMA	Día 0 +17aa/-17aa	Día 10 de cultivo +17aa/-17aa	Día 20 de cultivo +17aa/-17aa
8	LMA-M2	CD34 ⁺ 68.7%/31.6% MN: NO	*Control CD34 ⁺ 25%/10.8% CD34 ⁺ G+GM 27.06%/15.38%	*Control CD34 ⁺ 10.6%/7.81% CD34 ⁺ G+GM 61.2%/24%
9	LMA-M2	CD34 ⁺ 40%/20.7% MN 26.3%/6.5%	*Control CD34 ⁺ 12.6%/5.2% *Control MN 2.02%/1.2% CD34 ⁺ G+GM 6.3%/1.7% MN G+GM 5.4% 3.2%	*Control CD34 ⁺ 4.4%/2.1% *Control MN 1.5% ♦ CD34 ⁺ G+GM 3.2%/2%
10	LMA-M4	CD34 ⁺ 37%/37.5% MN 22%/21.3%	*Control CD34 ⁺ 10.5%/4.2% CD34 ⁺ G+GM 6.7%/3.5% MN G+GM 11.7%/4.7%	*Control CD34 ⁺ 18%/12% *Control MN 10.4%/9.3% MN G+GM 14%/11.3%
11	LMA-M3	CD34 ⁺ 40.4%/13% MN 44%/18.5%	*Control CD34 ⁺ 62%/12% *Control MN 66%/22.2% CD34 ⁺ G+GM 44%/7% MN G+GM 44%/9%	CD34 ⁺ G+GM 39.5%/10% MN G+GM 15%/3%
PROMEDIO		CD34 ⁺ x= 46.5% / 25.7% MN x= 30.7% / 15.4%	▲CD34 ⁺ x= 21% / 6.9% ▲MN x= 20.3% / 5.6%	▲CD34 ⁺ x= 34.6% / 12% ▲MN x= 14.5% / 7%
CORDÓN UMBILICAL		Día 0	Día 7	Día 14
5		MN 7.7%/3%	*Control MN 9.2%/5.1% MN G+GM 16.8%/10.6%	MN G+GM 19.7%/6.3%

♦ No fue posible cuantificar la banda -17aa. * Designación utilizada para el cultivo sin factores.

G+GM Designación utilizada para el cultivo con factores de crecimiento hematopoyético.

NO No obtenidas ▲ Promedios de las células que fueron cultivadas con factores de crecimiento

Tabla 4. Porcentajes de las isoformas WT1+KTS y WT1-KTS durante el periodo de cultivo con factores de crecimiento hematopoyético.

PACIENTE	SUBTIPO LMA	Día 0 +KTS/-KTS	Día 10 de cultivo +KTS/-KTS	Día 20 de cultivo +KTS/-KTS
8	LMA-M2	CD34 ⁺ 19.8%/11.4% MN: NO	*Control CD34 ⁺ 5.5%/2.04% CD34 ⁺ G+GM 26.7%/21.6%	*Control CD34 ⁺ 9.9% CD34 ⁺ G+GM 54.6%/14.6%
9	LMA-M2	CD34 ⁺ 52%/16% MN 69.3%/20%	*Control CD34 ⁺ 19.2%/10.3% *Control MN 23.5%/12.3% CD34 ⁺ G+GM 19.2%/9.6% MN G+GM 17.1%/11.6%	*Control CD34 ⁺ 12%/12.6% *Control MN 15.6%/9.5% CD34 ⁺ G+GM 17.6%/15.4%
10	LMA-M4	CD34 ⁺ 66.3%/19.2% MN 55.5%/19.5%	*Control CD34 ⁺ 22%/12% CD34 ⁺ G+GM 26.5%/7.2% MN G+GM 22%/7.2%	*Control CD34 ⁺ 38%/13.8% *Control MN 24.4%/9.4% MN G+GM 25.2%/13.6%
11	LMA-M3	CD34 ⁺ 59.5%/30% MN 76.5%/28%	*Control CD34 ⁺ 92.2%/44% *Control MN 101%/51% CD34 ⁺ G+GM 57.6%/23% MN G+GM 79%/36%	CD34 ⁺ G+GM 47.5%/28% MN G+GM 30%/14.5%
PROMEDIO		CD34 ⁺ x=49.4% / 19% MN x= 67% / 22.5%	▲CD34 ⁺ x= 32.5% / 15.3% ▲MN x= 39.3% / 18.2%	▲CD34 ⁺ x= 40% / 19.3% ▲MN x= 27.6% / 14%
CORDÓN UMBILICAL		Día 0	Día 7	Día 14
5		CD34 ⁺ 13%/11.5%	*Control MN 18.3%/12.7% MN G+GM 15.5%/12.6%	MN G+GM 31.6%/29.7%

*Designación utilizada para el cultivo sin factores de crecimiento. G+GM Designación utilizada para el cultivo con factores de crecimiento. NO: No obtenidas ▲ Promedios de las células que fueron cultivadas con factores de crecimiento

La relación entre las isoformas +17aa/-17aa en los pacientes analizados durante el periodo de cultivo, varió de 1:1 hasta 6.2:1 y la mayor presencia de la isoforma +17aa se encontró a los 10 días de cultivo. En las CMN esta isoforma tuvo una mayor presencia en el día 20, con una proporción de 5:1. En las células de cordón umbilical la mayor presencia de +17aa se vio al igual que en las CMN, a los 20 días de cultivo.

La relación entre las isoformas +KTS/-KTS tuvo variaciones desde 1.1:1 hasta 3.7:1. Las CMN mostraron mayor presencia en el día 0. Existió poca variación en el uso de las isoformas en las células de cordón umbilical (Tabla 5).

Por otro lado, se vio que la proliferación en el paciente 8 aumentó a 7.5×10^6 células al día 10 y disminuyó a 2.6×10^6 el día 20. En el paciente 9 la proliferación de las células leucémicas disminuyó al día 10 a 241 000 células y aumentó a 832 000 células al día 20. Por el contrario, las CMN de ese paciente mostraron una disminución a lo largo del periodo de cultivo. Las células leucémicas del paciente 10 presentaron un aumento en la proliferación hacia el día 20, de 10×10^6 inicialmente, a 11×10^6 . El número de CMN de este paciente disminuyó al día 10 y aumentó al día 20, aunque este aumento no alcanzó al número de células del día 0. En el paciente 11 se observó una disminución a lo largo del periodo de cultivo de 8×10^6 a 2.6×10^6 , sus CMN tuvieron un comportamiento similar al observado en las CMN del paciente 10. Las células de sangre de cordón umbilical se comportaron de igual manera que las CMN de los pacientes 10 y 11 (Tabla 6).

Las características morfológicas tanto de las células leucémicas como de las normales al día 0 fueron las de blastos típicos con una proporción núcleo: citoplasma alta (Figura 18 A). Después del periodo de cultivo las células mostraron señales de diferenciación granulocítica y monocítica con núcleos de forma irregular y una proporción reducida núcleo:citoplasma (Figura 18 B, C, D, E).

Tabla 5. Relación entre las isoformas 17aa y KTS a través del tiempo.

PACIENTE	SUBTIPO LMA	+17aa/-17aa día 0	+17aa/-17aa día 10	+17aa/-17aa día 20
8	LMA-M2	CD34* 2.2:1 MN: NO	Control CD34* 2:1 G+GM 1.7:1	CD34* control1.3:1 G+GM 2.5:1
9	LMA-M2	CD34* 1.9:1 MN 4:1	Control CD34* 2.4:1 Control MN 1.7:1 CD34* G+GM 3.7:1 MN G+GM 1.7:1	CD34* control1.3:1 CD34* G+GM1.6:1
10	LMA-M4	CD34* 1:1 MN 1:1	*Control CD34* 2.5:1 CD34* G+GM 1.9:1 MN G+GM 2.4:1	*Control CD34* 1.5:1 *Control MN 1.1:1 MN G+GM 1.2:1
11	LMA-M3	CD34* 3.1:1 MN 2.3:1	*Control CD34* 5.1:1 *Control MN 3:1 CD34* G+GM 6.2:1 MN G+GM 4.8:1	CD34* G+GM 3.9:1 MN G+GM 5:1
PROMEDIO		CD34*x= 2:1 MN x= 2.4:1	CD34*x= 3.4:1 MN x= 3:1	CD34*x= 2.6:1 MN x= 3:1
CORDÓN UMBILICAL		Día 0	Día 10	Día 14
5		MN 2.6:1	Control MN 1.8:1 MN G+GM 1.6:1	MN G+GM 3.1:1
PACIENTE	SUBTIPO LMA	+KTS/-KTS día 0	+KTS/-KTS día 10	+KTS/-KTS día 20
8	LMA-M2	CD34* 1.7:1 MN: NO	Control CD34* 2:7 CD34* G+GM 1.2:1	CD34* G+GM 3.7:1
9	LMA-M2	CD34* 3.2:1 MN 3.4:1	Control CD34* 1.8:1 Control MN 2:1 CD34* G+GM 2:1 MN G+GM 1.5:1	Control CD34* 1:1 Control MN 1.6:1 CD34* G+GM1.1:1
10	LMA-M4	CD34* 3.4:1 MN 2.8:1	*Control CD34* 1.8:1 CD34* G+GM 3.6:1 MN G+GM 3:1	*Control CD34* 2.7:1 *Control MN 2.5:1 MN G+GM 1.8:1
11	LMA-M3	CD34* 2:1 MN 2.7:1	*Control CD34* 2:1 *Control MN 2:1 CD34* G+GM 2.5:1 MN G+GM 2.1:1	CD34* G+GM 1.6:1 MN G+GM 2:1
PROMEDIO		CD34*x= 2.6:1 MN x= 3:1	CD34*x= 2.3:1 MN x= 2.2:1	CD34*x= 2.1:1 MN x= 2:1
CORDÓN UMBILICAL		Día 0	Día 10	Día 14
5		MN 1.1:1	Control MN 1.4:1 MN G+GM 1.2:1	MN G+GM 1.1:1

*Designación utilizada para el cultivo sin factores de crecimiento. G+GM Designación utilizada para el cultivo con factores de crecimiento. NO: No obtenidas

Tabla 6. Número de células a lo largo del periodo de cultivo.

PACIENTE	SUBTIPO LMA	Día 0	Día 10 de cultivo	Día 20 de cultivo
8	LMA-M2	CD34 ⁺ 2x10 ⁶ MN: NO	*Control CD34 ⁺ 1x10 ⁶ CD34 ⁺ G+GM 7.5x10 ⁶	*Control CD34 ⁺ 2.3x10 ⁴ CD34 ⁺ G+GM 2.6x10 ⁶
9	LMA-M2	CD34 ⁺ 2x10 ⁶ MN 2x10 ⁶	*Control CD34 ⁺ 241 000 *Control MN 2x10 ⁶ CD34 ⁺ G+GM 241 000 MN G+GM 2x10 ⁶	*Control CD34 ⁺ 351 000 *Control MN 343 750 CD34 ⁺ G+GM 832 500 MN G+GM 465 750
10	LMA-M4	CD34 ⁺ 2x10 ⁶ MN 2x10 ⁶	*Control CD34 ⁺ 1.4x10 ⁶ CD34 ⁺ G+GM 10.2x10 ⁶ *Control MN 1x10 ⁶ MN G+GM 5.6x10 ⁶	*Control CD34 ⁺ 1.35x10 ⁶ CD34 ⁺ G+GM 11x10 ⁶ *Control MN 775 000 MN G+GM 8x10 ⁶
11	LMA-M3	CD34 ⁺ 2x10 ⁶ MN 2x10 ⁶	*Control CD34 ⁺ 276 250 *Control MN 332 500 CD34 ⁺ G+GM 3 396 250 MN G+GM 2.04x10 ⁶	*Control CD34 ⁺ 62 500 *Control MN 225 000 CD34 ⁺ G+GM 2.6x10 ⁶ MN G+GM 2.4x10 ⁶
CORDÓN UMBILICAL		Día 0	Día 7	Día 14
5		MN 2x10 ⁶	*Control MN 9.5x10 ⁴ MN G+GM 4.3x10 ⁶	MN G+GM 12x10 ⁶

*Designación utilizada para el cultivo sin factores de crecimiento. G+GM Designación utilizada para el cultivo con factores de crecimiento. NO: No obtenidas

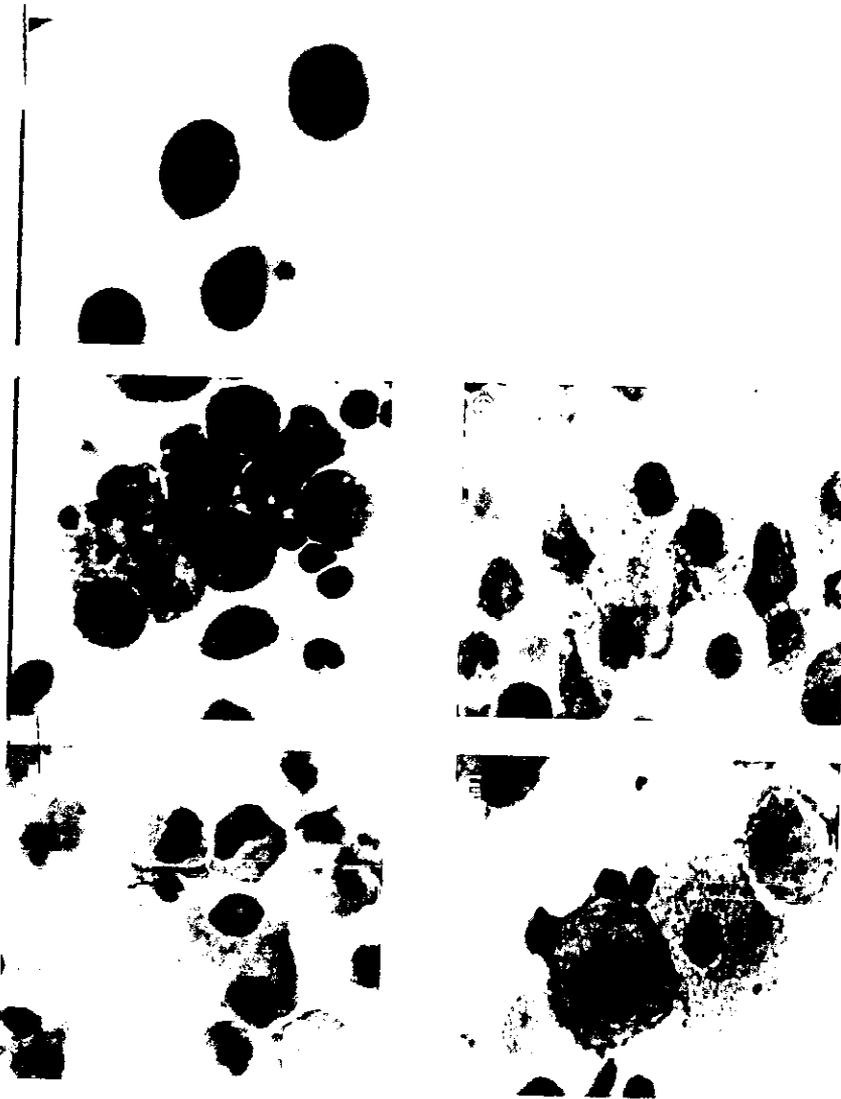


Figura 18. Cambios morfológicos de las células CD34⁺lin⁻ leucémicas y normales al día 0 y 20 días después de haber sido cultivadas con G-CSF y GM-CSF (7 y 14, para las normales). A) Células CD34⁺lin⁻ presentes en médula ósea leucémica y cordón umbilical, B, C) Células normales de cordón umbilical a 7 y 14 días de ser mantenidas en cultivo, se observan diversos monocitos y macrófagos. D, E) Estados de diferenciación de blastos a monocitos después de cultivar 20 días los blastos leucémicos. Después de 20 días se observan células semejantes a monocitos y macrófagos, tanto en el cultivo control (D), como en el cultivo con factores de crecimiento hematopoyético (E).

DISCUSION

La expresión del gen WT1 en las células hematopoyéticas se restringe a las células con un fenotipo inmaduro (Inoue y col., 1994). Diversos investigadores han demostrado que la población de células hematopoyéticas que presentan el antígeno de superficie CD34⁺ contienen sólo a células con fenotipo inmaduro y que durante el subsiguiente proceso de maduración, la expresión de WT1 disminuye para permitir la diferenciación terminal.

En el presente trabajo se encontró que las células hematopoyéticas CD34⁺lin⁻ leucémicas tienen una mayor expresión del gen WT1 que las células de cordón umbilical, similar a lo señalado por Inoue y col. (1997). Sin embargo, investigadores como Frazier y col. (1995), y Sugiyama y col. (1997), encuentran que la expresión de WT1 en células de médula ósea normal y sangre de cordón umbilical es similar a la de células leucémicas.

Los dos tipos celulares analizados en este trabajo expresaron las isoformas +17aa, -17aa, +KTS, -KTS, generadas por el procesamiento alternativo del RNAm del gen WT1. El balance entre las isoformas correspondió con lo señalado en la literatura (Haber y col., 1991; Renshaw y col., 1997). Aunque en el caso del paciente 5 se observó una relación de +KTS/-KTS muy alta (10:1), ésta relación tan alta no se debió a contaminación en la reacción, ni exceso de cDNA y no fue posible repetir la reacción, así que no hubo explicación para ese dato.

La isoforma con las inserciones 17aa y KTS fue la más abundante con respecto a la que carece de ellas. Esto se puede relacionar con las funciones normales señaladas para la isoforma +17aa+KTS, que consiste en su acción como un represor de la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular y por lo tanto es de esperarse que su expresión sea mayor durante la hematopoyesis. Se ha demostrado que WT1 participa en la regulación de diversos genes asociados a proliferación, entre los cuales tenemos a los genes de la cadena α del factor de crecimiento derivado de plaquetas y del Factor estimulante de colonias 1, (Gashler y col., 1992 y Harrington y col., 1993). Sin embargo, Ellinsen y col. (2001), sugieren que la adquisición de mutaciones en las células leucémicas puede volverlas insensibles a los efectos de WT1.

Ellinsen y col. (2001), encontraron que con la técnica de RT-PCR para una sola célula, la expresión de WT1+KTS en las células de médula ósea normal tuvo un patrón bifásico a lo largo de un periodo de cultivo de 14 días, donde WT1 estuvo presente en los

progenitores primitivos, ausente en los progenitores comprometidos hacia un linaje y nuevamente presente en poblaciones más diferenciadas. Ninguno de los pacientes analizados en este trabajo se comportó de acuerdo a ese patrón, ya que la expresión de las diferentes isoformas de WT1 en las células leucémicas analizadas fue variable entre pacientes (Figura 19). Posiblemente estas diferencias son resultado del tipo celular empleado en este estudio (células de médula ósea leucémica), de modo que la condición neoplásica de las células podría estar alterando ese patrón normal de expresión.

La diferencia observada entre la expresión de WT1 en las células normales de cordón umbilical y la encontrada en médula ósea normal por Ellinsen y col. (2001), probablemente se deba a que se analizó una muestra de células mononucleares, las cuales presentan heterogeneidad en la expresión de WT1 debido al grado de diferenciación.

En este estudio se encontró que en las células leucémicas la relación en la expresión del exón 5 (+17aa/-17aa) tuvo mayor variación a lo largo del periodo de cultivo que las isoformas del exón 9. Para las isoformas +17aa/-17aa, en el día 0 se observó en promedio una relación de 2:1, ésta se incrementó al día 10 (3.4:1) y disminuyó al día 20 (2.6:1). Esta relación fue semejante a la observada en la muestra de CMN de cordón umbilical (Tabla 5). Con lo que respecta al exón 9, la relación +KTS/-KTS presentó una ligera disminución después del día 0 al día 20 de cultivo (de 2.6:1 a 2.1:1), como se observa en la Tabla 5. Mientras que, en la muestra de CMN de cordón umbilical no hubo variación en la relación entre estas isoformas durante el periodo de cultivo.

Estos resultados sugieren que WT1 se expresa de manera variable tanto en células leucémicas como en células normales de médula ósea, como lo han sugerido diversos investigadores (Baird y Simmons, 1997; Ellinsen y col., 2001).

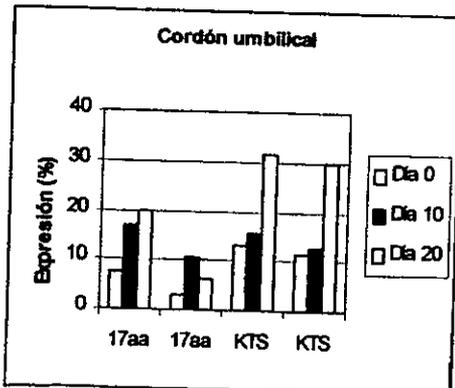
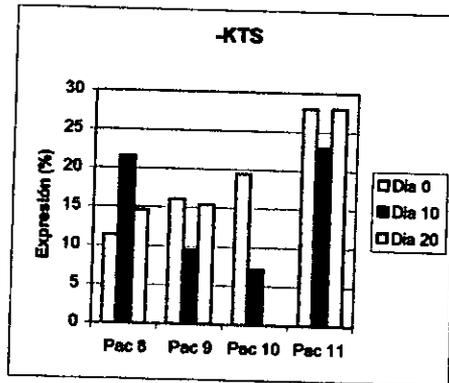
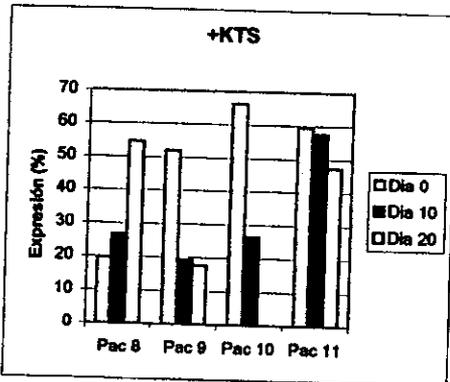
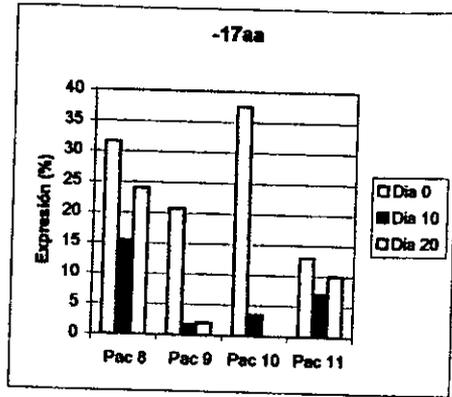
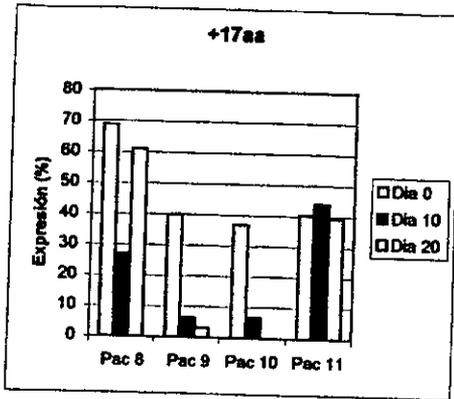


Figura 19. Representación gráfica de la expresión de las diferentes isoformas de WT1 en las células leucémicas de los pacientes analizados. Únicamente se presentan los datos obtenidos para las células mantenidas en cultivo con los factores de crecimiento hematopoyético por 0, 10 y 20 días. Pac: Paciente

Hasta ahora el análisis de los efectos de las diferentes isoformas sobre el crecimiento celular en líneas celulares leucémicas ha generado datos conflictivos (Renshaw y col., 1997; Ellinsen y col., 2001). Por ejemplo Yamagami y col. (1996), mediante oligonucleótidos antisentido contra WT1 en células K562, disminuyeron su expresión, lo que ocasionó una disminución en la proliferación. Por otro lado, Svedberg y col. (1999) encuentran que la sobreexpresión de las cuatro isoformas de WT1 no afecta la tasa de crecimiento en estas mismas células.

En este trabajo al comparar la expresión de WT1 y el número de células de los pacientes analizados, se observó que no hay relación entre el aumento ó disminución de la expresión de las isoformas de WT1 y el número de células. En el paciente 8 hubo una disminución temporal en la expresión de WT1 hacia el día 10 de cultivo y un aumento en el número de células, a continuación un aumento en la expresión de WT1 en el día 20 y una disminución en el número de células. En el paciente 9 donde la expresión de WT1 a lo largo del periodo de cultivo fue disminuyendo, se observó una mayor proliferación en el cultivo después del día 0. El paciente 10 mostró una disminución en la expresión de WT1 en el día 10 y un aumento al día 20 y con respecto a la proliferación celular, ésta aumentó después del día 0. Finalmente en el paciente 11 la expresión de WT1 disminuyó a lo largo del periodo de cultivo, mientras que la proliferación tuvo poca variación. Por otro lado, las células de sangre de cordón umbilical presentaron un incremento gradual tanto en la expresión de WT1 como en la proliferación durante el periodo de cultivo. La aparente no relación entre los niveles de WT1 y el número de células neoplásicas y de cordón, se podría explicar considerando lo sugerido por Kudoh y col. (1996), que proponen la existencia de un nivel umbral de expresión de WT1 para inhibir la proliferación. Esto se observa en los pacientes 8 y 11, donde el número de células disminuyó cuando los niveles de las isoformas de WT1 se mantuvieron altos, mientras que en los pacientes 9 y 10, el número de células se incrementó cuando los niveles de expresión fueron muy bajos (día 20), con respecto a los observados el día 0.

Las células leucémicas de los pacientes analizados presentaron características de diferenciación del linaje monocítico a partir del día 10 de cultivo, si las células fueron o no funcionales no se valoró. Estos resultados fueron semejantes a los obtenidos por Smith y col. (1998) quienes encontraron que la expresión de WT1 lleva a la diferenciación de

blastos M1 a través del linaje monocítico y de Svedberg y col. (1999), quienes demuestran que la expresión constitutiva de WT1 en células K562 no bloquea la inducción a la diferenciación en estas células. Por otro lado, Svedberg y col. (1998) e Inoue y col. (1998), señalan que la expresión persistente de WT1 impide la diferenciación de las líneas celulares U937 y 32Dcl3. Esta aparente controversia puede deberse a que, el bloqueo en el proceso de diferenciación se ha observado en cultivos de líneas celulares leucémicas y no en células de pacientes con leucemia, y como sabemos, las condiciones *in vitro* no siempre igualan a las condiciones *in vivo*.

Con base a lo obtenido en este trabajo y a lo publicado por diversos investigadores, posiblemente la presencia de WT1 no es un requisito general para la maduración de las células hematopoyéticas y como lo señalan King-Underwood y Pritchard-Jones (1998), pudiera tener una función redundante en la hematopoyesis, ya que en experimentos con ratones "knock-out" que carecen de WT1, se ha visto que el gen es esencial para el desarrollo del sistema urogenital, debido a que los ratones mueren antes de nacer por falta de riñones, sin embargo su ausencia no tuvo ningún efecto obvio sobre el sistema hematopoyético.

Debido a que hasta ahora no se ha comprendido de manera clara cual es el papel de las isoformas de WT1 en la hematopoyesis y mucho menos durante el proceso neoplásico, se hace necesario realizar más estudios sobre la interacción de las isoformas durante el proceso hematopoyético normal.

Finalmente es necesario destacar que la variación observada en la expresión del gen WT1 en los pacientes analizados, debe ser tomada con precaución ya que se trató de muestras provenientes de diferentes subtipos de LMA, lo que indica una heterogeneidad de alteraciones genéticas que pueden estar influyendo sobre la regulación de WT1. Es necesario realizar un análisis más amplio utilizando una mayor cantidad de muestras provenientes de un mismo subtipo de LMA y utilizar un método alternativo a la RT-PCR semicuantitativa para obtener los niveles del transcrito, debido a la dificultad en la reproducibilidad que presenta esta técnica (ver Apéndice).

CONCLUSIONES

Las células $CD34^+lin^-$ de los pacientes analizados con leucemia mieloblástica aguda y las células $CD34^+lin^-$ no leucémicas de cordón umbilical expresaron las cuatro isoformas generadas por el procesamiento alternativo del RNAm del gen WT1 y sus niveles de expresión fueron mayores en las células leucémicas. La isoforma más abundante fue +17aa+KTS en ambos tipos celulares.

Las células leucémicas y de cordón umbilical cultivadas con los factores de crecimiento hematopoyético, CSF-G y CSF-GM, presentaron variación en la expresión del gen WT1. En las células leucémicas la expresión de WT1 tuvo un efecto dual sobre la proliferación. Cuando la expresión fue alta al final del periodo de cultivo, disminuyó el número de células. Mientras que cuando los niveles de expresión al final del periodo de cultivo fueron bajos, con respecto a los observados al inicio de éste, hubo un aumento en el número de células.

Una de las funciones del gen WT1 es disparar el proceso de diferenciación en diversos linajes celulares incluyendo el hematopoyético. De modo que no se expresa en células maduras normales, sin embargo en las células leucémicas y de cordón umbilical analizadas en este trabajo se observó la expresión de manera persistente y esto no fue un obstáculo para la presencia de características morfológicas de diferenciación en esas células.

APÉNDICE

Dado que la finalidad de la RT-PCR semicuantitativa es determinar el nivel de expresión de un gen, al medir la cantidad de producto amplificado con respecto a un estándar interno, diversos parámetros deben ser tomados en cuenta, debido a que existe el problema de obtener una especificidad, sensibilidad y reproducibilidad adecuadas.

Ya que el producto amplificado se incrementa de manera exponencial, es necesario realizar las mediciones antes de alcanzar la fase de meseta, sin olvidar que existe una gama de factores que pueden afectar la eficiencia de amplificación, debido a que todos los componentes de la reacción son interdependientes.

Durante la realización de este trabajo se encontraron algunos de estos inconvenientes por lo que fue necesario optimizar la T_m para el alineamiento de los iniciadores (oligonucleótidos) con la finalidad de evitar la aparición de fragmentos inespecíficos que compitieran por el nucleótido marcado. Debido a que se probaron las temperaturas de alineamiento de más de 10°C del valor teórico predicho por el programa OLIGO y los productos inespecíficos seguían apareciendo, se decidió utilizar Dimetilsulfóxido (DMSO) para eliminarlas (Figura 1).

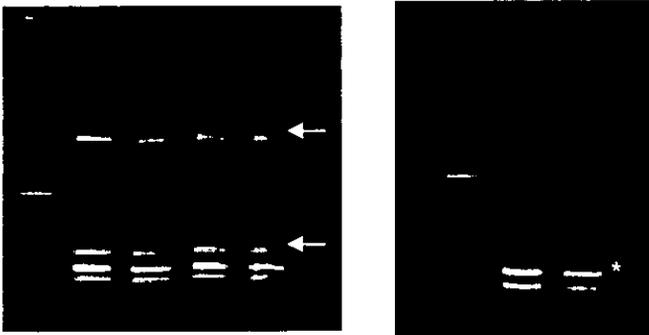


Figura 1. Presencia de bandas inespecíficas (señaladas por las flechas) durante la amplificación de las isoformas de WT1, en este caso se ejemplifican las bandas correspondientes al exón 9 (*).

Sin embargo, al utilizar DMSO se bloqueó la amplificación del control interno (β -actina), por lo que en el presente trabajo las amplificaciones se realizaron sin DMSO. Las bandas inespecíficas que aparecieron en los ensayos no fueron consideradas para el análisis densitométrico.

Para minimizar las variaciones entre las muestras se realizó una amplificación simultánea, en cada tubo, de la muestra problema (cDNAs de WT1) y de un fragmento del cDNA de β -actina, el cual se expresa en muchos tipos celulares, aunque al igual que otros RNAs empleados como control, en algunos casos puede presentar variación en sus niveles de expresión (Figura 2).



Figura 2. Durante la amplificación de β -actina en los pacientes 8 y 10 se observó variación en la intensidad del fragmento correspondiente a dicho control interno.

También es importante tomar en cuenta el ciclo de PCR en el cual se obtiene el producto que será cuantificado para no obtener un producto fuera de la linealidad de la reacción, lo cual afectaría la intensidad de las bandas a comparar y generaría un análisis densitométrico erróneo (Figura 3). Durante la realización de este análisis es posible que los valores para el día cero del exón 9 del paciente 10, se hayan obtenido fuera de la linealidad de la reacción. Se considera que esto no ocurrió en el resto de las células cultivadas, debido a que la literatura señala que el número de moléculas de RNAm de WT1 disminuye al iniciarse la diferenciación celular. Por otro lado, el fragmento de β -actina amplificado para cuantificar las isoformas en algunos casos del paciente 8 y del exón 5 del paciente 9 pueden estar de igual manera fuera de la linealidad, para resolver este problema y minimizar el error que podría generarse al agregar los oligonucleótidos para β -actina después de iniciada la amplificación del exón de WT1, se optó por utilizar la mitad de los oligonucleótidos para amplificarlo.

Finalmente es recomendable realizar al menos una repetición de cada reacción para amortiguar los cambios en la eficiencia de amplificación de cada reacción. En este caso no fue posible realizar este último punto a causa del número variable de células disponibles.

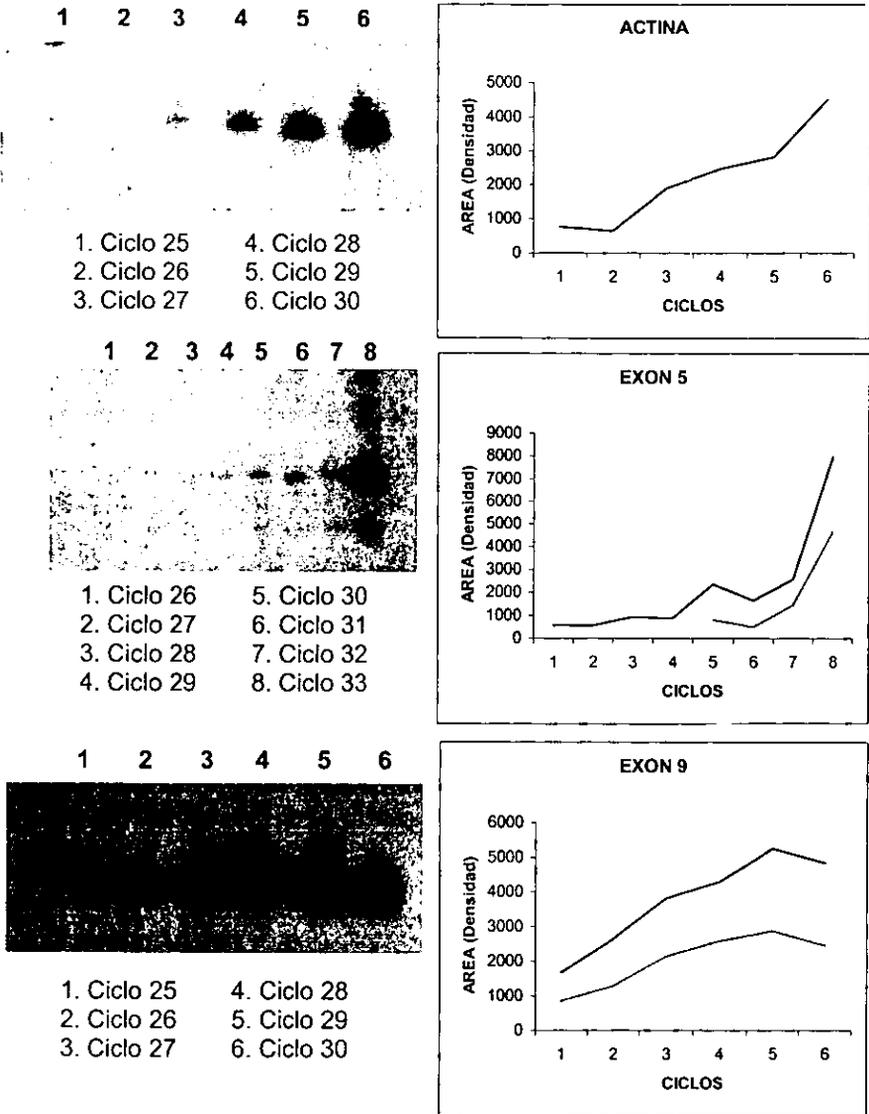


Figura 3. Comportamiento de los productos a diferentes ciclo de amplificación hasta llegar a los 30 ciclos (33 en el caso del exón 5), para verificar la linealidad de la reacción. Como puede observarse para β -actina y el exón 5 la reacción aún no alcanza la fase de meseta, no así para el exón 9 donde la amplificación está fuera de la linealidad a los 30 ciclos. (Las dos bandas que se ven en la amplificación de los exones 5 y 9 corresponden a sus dos isoformas).

REFERENCIAS

- Baird, P. N. y Simmons, P. J. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp. Hematol.* 1997; 25:312-320.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I. y Dick, J. E. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Med.* 1998; 4(9):1038-1045.
- Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E. y Hoelzer D: High levels of Wilms' Tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood*, 1997; 90:1217-1225.
- Blencowe, B. J. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *TIBS*, 2000; 20: 106-110.
- Bonnet, D. y Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med* 1997; 3(7): 730-737.
- Caricasole, A., Duarte, A., Larsson, S. H., Hastie, N. D., Little, M., Holmes, G., Todorov, I. y Ward, A. RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 7562-7566.
- Chomczynski P. y Nocoletta Sacchi.. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 1987; 162: 156-159.
- Cline, M. J. The molecular basis of leukemia. *N Engl J Med.* 1994; 330(5): 328-336.
- Coppes, M. J., Campbell, C. E. y Williams, R. G. The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. *FASEB J*, 1993; 7: 886-895.
- Davies R. C., Calvio, C., Bratt, E., Larsson, S. H., Lamond, A. I. y Hastie, N. D. WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev.* 1998; 12:3217-3225.
- Davies, R. C., Bratt, E. y Hastie N. D. Did nucleotides or amino acids drive evolutionary conservation of the WT1+/-KTS alternative splice? *Hum Mol Genet.* 2000; 9(8): 1177-83.
- Deuel, T. F., Guan, L. y Wang, Z. Wilms' tumor gene product WT1 arrests macrophage differentiation of HL-60 cells through its zinc-finger domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 254: 192-196.

- Drummond, I. A., Rupprecht, H. D., Rohwer-Nutter, P., Lopéz-Guisa, J. M., Madden, S. L., Rauscher III, F. J., y Sukhatme, V. P. DNA Recognition by splicing variants of the Wilm's tumor suppressor, WT1. *Mol Cell Biol*, 1994; 14: 3800-3809.
- Ellinsen, L. W., Carlsson, N., Cheng, T., Scadden, D. T. y Haber D. A. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J*. 2001; 20(8):1897-1909.
- Englert C: WT1-more than a transcription factor?. *TIBS* 1998; 23:389-393.
- Englert, C., Hou, X., Maheswaran, S., Benett, P., Ngwu, C., Re, G. G., Garvin, A. J., Rosner, M. R. y Haber, D. A. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J*. 1995; 14(19):4662-4675.
- Englert, C., Maheswaran, S., Garvin, A. J., Kreidberg, J., y Haber, D. A. Induction of p21 by Wilms' tumor suppressor gene WT1. *J. Cancer Res*, 1997; 57: 1429-1434.
- Frazier, G. C., Patmasiriwat, P., Zhang, X. y Saunders, G. F. Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow. *Blood* 1995; 86: 4704-4706
- Gashler, A. I., Bonthron, D. T., Madden, S. L., Rauscher, F. J. III, Collins, T., y Sukhatme, V. P. Human Platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms' Tumor suppressor WT1. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1992, 89:10984-10988.
- Habert, D. A., Sohn, R. L., Buckler, A. J., Pelletier, J., Call, K. M. y Housman, D. E. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumor gene WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88: 9618-9622.
- Habert, D. A., Park, S., Maheswaran, S., Englert, C., Re, G. G., Hazen-Martin, D. J., Sens, D. A. y Garvin, A. J. WT1-mediated growth suppression of Wilms tumor cells expressing a WT1 splicing variant. *Science*, 1993; 262:2057-2059.
- Harrington, M. A., Konicek, B., Song, A., Xia, X., Fredericks, W. J. y Rauscher III, F. J. Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' Tumor locus. *J Biol Chem*. 1993, 268 (28):21271-21275.
- Hastie N. D. Wilms' tumour gene and function. *Genet. Dev*. 1993; 3:408-413.

- Hastie N. D. The genetics of Wilms' tumor-A case of disrupted development. *Annu. Rev. Genet.* 1994; 28:523-558.
- Hewitt, S. M., Fraizer, G. C., Wu, Ying-Ji, Rauscher III, F. J. y Saunders, G. F. Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 1996; 8588-8592.
- Hewitt, S. y Saunders, G. F. Differentially spliced exon 5 of the Wilms' tumor gene WT1 modifies gene function. *Anticancer Res.* 1996; 16:621-626.
- Huss, R. Isolation of primary and immortalized CD34 hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells* 2000; 18:1-9.
- Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakawaga M, Yamagami T, Miwa H, Kita K, Hiraoka A, Nasu K, Kyo T, Dohy H, Nakauchi H, Ishidate T, Akiyama T y Kishimoto T: WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 1994;84:3071-3079.
- Inoue K, Ogawa H, Yamagami T, Soma T, Tani Y, Tatekawa T, Oji Y, Tamaki H, Kyo T, Dohy H, Hiraoka A, Masaoka T, Kishimoto T y Sugiyama H. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms Tumor Gene) Expression levels. *Blood.* 1996; 88(6):2267-2278.
- Inoue, K., Ogawa, H., Sodona, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T. and Sugiyama, H. Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood.* 1997; 89(4): 1405-1412.
- Inoue K, Sugiyama H, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim EU, Kawakami M, Akiyama T, Kishimoto T y Sugiyama H: Wilms' Tumor gene (WT1) compete with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood*;1998; 91:2969-2976.
- Jiménez C, Rodríguez M. *Biología Molecular en Medicina. Colección de textos politécnicos.* 1998, 225 p.
- Kawasaki, E.S. Amplification of RNA. In: *PCR Protocols, a guide to methods and applications.* Innis et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego, CA. 1991, pp 21-27.
- Klamt, B, Koziell, A, Poulat, F, Wieacker, P, Scambler, P, Berta, P y Gessler, M. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1+/-KTS splice isoforms. *Hum. Mol. Gen.* 1998; 4, 7:709-714.

- King-Underwood L. y Pritchard-Jones K. Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance. *Blood* 1998; 8,91:2961-2968.
- Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I. y May, W. s. CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996; 87(1): 1-13.
- Kudoh, T., Ishidate, T., Moriyama, M., Toyoshima, K. y Akiyama, T. G₁ phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92:4517-4521.
- Kudoh, T., Ishidate, T., Nakamura T., Toyoshima, K. y Akiyama, T. Constitutive expression of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in F9 embryonal carcinoma cells induces apoptotic cell death in response to retinoic acid. *Oncogene*, 1996; 13: 1431-1439.
- Laity, J. H, Dyson, H. J. y Wright, P. E. Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97: 11932-11935.
- Lamaki H, Ogawa H, Ohyashiki JH, Iwama H, Inoue K, Soma T, Oka Y, Tatekawa T, Oji Y, Isuboi N, Kim EH, Kawakami K, Fuchigami K, Tomonaga M, Toyama K, Aozasa K, Kishimoto T y Sugiyama H. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1999, 13:393-399.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, Peterson, B., Caligiuri, M. A. y Dick, J. E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-648.
- Larsson, S. H., Charlieu, J. P., Miyagawa, K., Engelkamp, d., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyningen, V. y Hastie, N. D. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*; 81: 391-401.
- Little M. H, Prosser, J., Condie, A., Smith, P. J., Heyningen, V van y Hastie, N. D. Zinc finger point mutations within the WT1 gene in Wilms tumor patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 4791-4795.
- Lee S. B, Huang, K, Palmer, R, Truong, V. B, Kolquist, K. A, Wong, J, Paulding, C, Yoon, S. K, Gerald, W, Oliner, J. D. y Haber, H. A. The Wilms tumor supressor WT1 encodes a transcriptional activator of *amphiregulin*. *Cell* 1999; 3, 98:663-673
- Löwenberg, B., Downing, J. R. y Burnett, A. Acute myeloid leukemia *N Engl J Med*. 1999; 341(14): 1051-1062.

- Maurer, U., Weidmann, E., Karakas, T., hoelzer, D. y Bergmann, L. Wilms tumor gene (wt1) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34+ progenitors. *Blood*. 1997; 90(10): 4230-4232.
- Mayani, H., Shen, S., Guilbert, L. J., Clark, S. C., Sych, I. y Janowska-Wieczorek, A. Effect of rhCSF-1 on human hemopoiesis in long-term cultures from patients with acute myelogenous leukemia. *Leukemia*. 1991; 5(1): 8-13.
- Mayani, H y Lansdorp, P. M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*. 1998; 16: 153-165.
- McCulloch, E. A. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). *Blood*. 1983; 62(1): 1-13.
- Menke, A., Shvarts, A., Riteco, N., van Ham, R., van der Eb, A. J. y Jochemsen, A. G. Wilms' Tumor 1-KTS isoforms induce p53-independent apoptosis that can be partially rescued by expression of the epidermal growth factor receptor or the insulin receptor. *Cancer Res*. 1997; 57: 1353-1363.
- Metcalf, D. y Nicola, N. A. Biological actions of the colony-stimulating factors in vitro. In: *The hemopoietic colony-stimulating factor. From biology to clinical applications*. Cambridge University Press. 1995.
- Moffett, P., Bruening, W., Nakagama, H., Bardeesy, N., Housman, D., Housman, D. E. y Pelletier, J. Antagonism of WT1 activity by protein self-association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 11105-11109.
- Murata, Y., Kudoh, T., Sgiyama, H., Toyoshima, K. y Akiyama, T. The wilms tumor supresor gene WT1 induces G1 arrest and apoptósis in myeloblastic leukemia M1 cells. *FEBS Lett*. 1997; 409: 41-45.
- Reddy J. C y Licht. J. D: The Wilms' tumor suppressor gene: How much do we really know?. *Biochem Biophys Acta* 1996;1287: 1-28.
- Renshaw, J., King-Underwood, L., y Pritchard-Jones, K. Differential splicing of exon 5 of the Wilms Tumor (WT1) gene. *Genes Chromosom. Cancer* 1997; 19: 256-266.
- Rupprecht, H. D., Drummond, I. A., madden, S. L., Rauscher III, F. J., y Sukhatme, V. P. The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J. Biol Chem*. 1994; 269, 8: 6198-6206.
- Sambrook B, Fritz EF y Maniantis T: *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbord 1989.

- Scharnhorst, V., Dekker, P., van der Eb, A. J. and Jochemsen, A. G. Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(33): 23456-23462.
- Schmid, D., Heinze, G., Linnerth, B., Tisljar, K., Kusec, R., Geissler, K., Sillaber, C., Laczika, K., Mitterbauer, M., Zöchbauer, S. y Gaiger, A. Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 639-643.
- Sekiya, M., Adachi, M., Hinoda, Y., Imai, K. y Yachi, A. Downregulation of Wilms' tumor gene (*wt1*) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells. *Blood* 194; 8(7): 1876-1882.
- Shivdasani, R. A. y Orkin, S. H. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood.* 1996; 87(10):4025-4039.
- Smith, S. I., Weil, D., Johnson, G. R., Boyd, A. W. y Li, C. L. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, is upregulated b leukemia inhibitory factor and induces monocytic differentiation in M1 leukemic cells. *Blood.* 1998; 91(3): 764-773.
- Smith, S I., Down, M., Boyd, A. W. y Li, C. L. Expression of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, reduces the tumorigenicity of the leukemic cell line M1 in C.B-17 scid/scid mice. *Cancer Res.* 2000; 60: 808-814.
- Sugiyama, H., Inoue, K., Soma, T., Tamalki, H., Oka, Y., Ogawa, H. y Kishimoto, T. Wilms tumor gene (*wt1*) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34⁺ progenitors. *Blood.* 1997, 90: (10):4230-4232.
- Sutherland, H. J., Blair, A. y Zapf, R. W. Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood.* 1996; 87(11): 4754-4761.
- Svedberg, H., Chylicki, K., Baldetorp, B., Rauscher, F. J. y Gullberg, U. Constitutive expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in the leukemic cell line U937 blocks parts of the differentiation program. *Oncogene*, 1998; 16: 925-932.
- Svedberg, H., Chylicki, K. y Gullberg, U. Downregulation of Wilms' tumor gene (WT1) is not a prerequisite for erythroid or megakaryocytic differentiation of the leukemic cell line K562. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 1057-1062.

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

Williams, G. T., Smith, C. a., Spooncer, E., Dexter, T. M. y Taylor, D. R. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990; 343: 76-79.

Williams J W, Beutler E, Erslev A J, Lichtman M A, Coller B S. y Kipps T J: Acute myelogenous leukemia in: Hematology. Mc Graw Hill. Fifth Edition New York 1995.

Yamagami T Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maegawa T. y Kishimoto T. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) Antisense oligodeoxynucleotides: Implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. *Blood*. 1996; 87, 7:2878-2884.