



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

“Determinación de la inducción de aberraciones cromosómicas por el factor estimulante de colonias de Granulocitos (G-CSF) sobre linfocitos T y células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de donadores”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

MARÍA SOTERA CHÁVEZ JACAL

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. BERTHA MOLINA ÁLVAREZ

MÉXICO, D. F.

ABRIL, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mis padres

Por su ejemplo de perseverancia, responsabilidad y amor al trabajo. Papá, yo creo donde estás te sientes orgulloso de mí, te adelantaste (ahí ya no hay sufrimiento), pero más tarde te seguiremos.

Bety

Gracias por toda tu paciencia y apoyo incondicional, amiga sólo hay una. Te has ganado el cielo.

Bertha

Tutores como tú hay pocos, muchas gracias por todo. Sigue con esa disposición y humildad, Dios te premiará.

Dra. Sara, Dr. Mario

Gracias mil por no "botarme" en todo el tiempo que tardé para titularme, agradezco sus consejos, y sigan siendo para sus estudiantes ejemplo de entrega a su trabajo. Dios los guarde.

Dr. Mayani, D. Zenteno

Muchas gracias por el tiempo que invirtieron en la revisión de la tesis, por su disposición, y por sus valiosos comentarios. Dios los bendiga.

Mi Dios

De forma muy especial todo mi agradecimiento para ti, sin tu fuerza, paciencia y amor no lo habría logrado. Sin ti no soy ni valgo nada.

Dónde está el sabio? Dónde está el escriba?.....No ha hecho Dios que la sabiduría de éste mundo sea necesidad?

1ª. Corintios 1.20

No os conforméis a este siglo, sino transformaos por medio de la renovación de vuestro entendimiento, para que comprobéis cuál sea la buena voluntad de Dios, agradable y perfecta.

Romanos 12:2

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.2 Células progenitoras hematopoyéticas (CPH)	2
1.3 Transplante de células hematopoyéticas	3
1.4 Factores estimuladores de colonias.....	5
1.5 Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CFS)	8
1.6 Receptor del G-CSF.....	10
1.7 Aplicaciones clínicas	12
2. Aberraciones cromosómicas	16
2.1 Aberraciones inestables.....	17
2.2 Aberraciones estables	22
2.3 Aberraciones cromosómicas como indicadoras de daño	24
3. Planteamiento del problema	27
4. Objetivos	28
5. Hipótesis	28
6. Material y métodos	29
7. Resultados	33
8. Discusión.....	41
9. Conclusiones.....	45
10. Perspectivas	46
11. Anexos	47
12. Referencias	50

RESUMEN

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) son células con capacidad limitada de renovación propia, incluyen a células de multilinaje, y células de linaje individual; son también conocidas como células formadoras de colonias y se localizan en la médula ósea (MO). Los procesos de proliferación y diferenciación de las CPH están regulados por los factores hematopoyéticos multipotenciales. Uno de estos es el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el cual actúa sobre las CPH de la MO para promover su maduración hacia granulocitos y producir un incremento en el número de neutrófilos en sangre periférica (SP). De manera muy importante el G-CSF tiene la propiedad de movilizar CPH de la MO a la SP en donadores para transplante alogénico, en pacientes candidatos a transplante autólogo, y en donadores no relacionados.

Se sabe que la movilización de CPH por el factor G-CSF no tiene efectos nocivos a nivel clínico para los donadores. En el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) al analizar el cariotipo de cuatro donadores (de diez que se observaron) tratados con el factor recombinante humano (rhG-CSF) para movilizar CPH, se observó un incremento en el número de algunas aberraciones cromosómicas inestables, como rompimientos cromosómicos y cromatídicos. Estos hallazgos sugirieron un posible efecto clastogénico del G-CSF, sin embargo, en la literatura no existen reportes de estudios de genotoxicidad, por lo cual, el objetivo de este trabajo fue determinar este efecto, para asegurar su uso en los donadores. La información obtenida en este proyecto es importante debido a que las células que se transplantan deben ser normales y libres de alteraciones cromosómicas.

La población de estudio estuvo constituida por nueve donadores de CPH y cinco individuos sanos como población control. A los donadores de CPH se les tomó muestra de sangre periférica heparinizada antes y después del estímulo con el G-CSF; al 4º y 5º día después del estímulo, mediante aféresis se realizó la colecta de CPH. A los individuos de la población control se les tomó una muestra de SP en tubo heparinizado. Con todas las muestras se hicieron cultivos de linfocitos y se cosecharon a las 48 horas para obtener metafases y analizar las posibles aberraciones

cromosómicas en cada individuo. El análisis de aberraciones cromosómicas se realizó en 100 metafases de cada cultivo en laminillas codificadas.

Se observó que el porcentaje promedio de aberraciones cromosómicas antes del estímulo fue de 2.0, y después se observó una ligera disminución, siendo el valor de 1.33; a diferencia de los donadores el porcentaje en la población control fue de 3.2, estos resultados se encuentran dentro de los valores normales de aberraciones cromosómicas en individuos sanos reportados en la bibliografía. De acuerdo a estos valores no hay diferencias significativas.

Estos resultados sugieren que el G-CSF no tiene efecto clastogénico sobre las células de los donadores de CPH, en consecuencia puede utilizarse sin ningún problema. Se observó además que este factor de crecimiento hematopoyético, ejerce sobre los linfocitos T un estado transitorio sin respuesta funcional disminuyendo el proceso de mitogénesis, lo que es de beneficio para el paciente que va a ser transplantado, ya que de esta forma se disminuye los síntomas de la enfermedad injerto *versus* hospedero, y en consecuencia la mortalidad debida a este evento.

SUMMARY

The progenitor cells hematopoietic (CPH) are cells with limited capacity of property renovation, it includes to cells of multifamily and cells of individual family; they are also known like formed cells colonies and they meet in the bone marrow (BM). The process of proliferation and differentiation of the CPH are regulated by the hematopoietic multipotential factors. One of these is the stimulate of colony of granulocytes factor (G-CSF), which it acts on the CPH of the BM to promote its mature to granulocytes and produce an increase in the number of neutrophils in the peripheral blood (PB). In any case very important the G-CSF has the property of move CPH of the BM to PB in givers for the allogenic transplant, in candidates patients to autologous transplant and in givers no relations.

It knows that the mobilization of CPH by the G-CSF factor doesn't have noxious effects to clinic level for the givers. In the cytogenetic laboratory of the Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) to analyze the cariotype of four givers (of the givers that they are observed) treated with the human recombinant factor (rhG-CSF) for mobilize CPH, it observed an increase in the number of some chromosome aberration unstable, like chromosomal break and chromatids. These finds become a clastogenic effect possible of the G-CSF, however, in the literature there is not studies genotoxicity reports, by which, the objective of this work was determine this effect, to assure its use in the givers. The information got in this project is important just to the cells that they are transplanted must be normal and free of chromosomal alters.

The study population was constituted by nine givers of CPH and five healthy persons like control population. To the CPH givers were got some peripheral blood heparinized before and after of the stimulate with the G-CSF; to the 4th and 5th day after the stimulated, through apheresis was made the collect of CPH. To the person of control population were got themselves a sample of PB in the heparinized tube. With all the samples was made some lymphocytes culture and they was harvest to 48 hours for getting metaphases and analyze the possible chromosomal aberration in each person. The analyze of chromosomal aberrations was made in 100 metaphases of each culture on code laminae.

It was observed that the average of chromosomal aberrations before the stimulated was of 2.0 and after it was observed a slight diminution, it was value of 1.33 to different of the givers the average of the control population was of 3.2, this results were found inside of the normal values of chromosomal aberrations in healthy persons reported in the papers. Agree to these values do not have significant differences.

These results suggest that the G-CSF do not have clastogenic effect on the cells of the CPH givers, in consequence can utility without some problem. It was observed besides that this increase hematopoietic factor, practice on the lymphocytes T a transient state without functional response decrease the mitogenesis process, that it a benefit for the patient that it is going to transplant, already this form decrease the sign of the disease like a host and like consequence the mortality just to this event.

ABREVIATURAS

CPH- Células progenitoras hematopoyéticas.

MO- Médula ósea.

SP- Sangre Periférica.

CFC- Células formadoras de colonias.

GVHD- Enfermedad Injerto contra Huésped.

rhG-CSF- Factor estimulador de colonias de granulocitos-recombinante humano.

HLA- Antígeno leucocitario humano.

G-CSF- Factor estimulador de colonias de granulocitos.

CSF- Factores estimuladores de colonias.

GM-CSF- Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

M-CSF o **CSF-1**- Factor estimulador de monocitos.

IL-3- Interleucina-3.

Multi-CSF- Factor estimulador de colonias de líneas múltiples.

CHO- Células de ovario de Hámster chino.

PIP2- Fosfatidilinositol bifosfato.

IP3- Inositol trifosfato.

ADN- Ácido desoxirribonucleico.

FISH- Hibridación *In situ* con fluorescencia.

IM-Índice Mitótico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hematopoyesis

La gran mayoría de los tejidos del cuerpo mantienen su estructura y función a través de la vida del individuo por la producción de células dentro de cada tejido, reemplazando a aquellas que se pierden por daño ó por envejecimiento. Uno de los procesos más complejos para la formación de células es el que se lleva a cabo en la médula ósea (MO), mediante el proceso de Hematopoyesis.

La hematopoyesis genera todas las células sanguíneas a partir de una célula tronco común. En general, las células tronco pluripotenciales (stem cells) se diferencian por acción de una red compleja de factores de crecimiento hematopoyéticos para originar estirpes celulares tales como la linfoide y mieloide (Vellenga *et al*, 1987; Lieschke *et al*, 1992). (Figura 1)

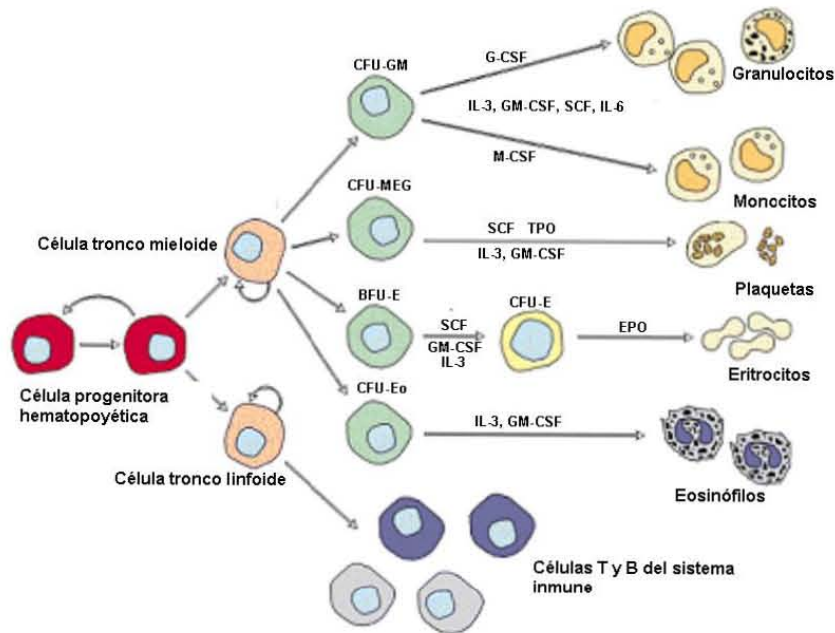


Figura 1. Hematopoyesis. Formación de las diferentes líneas celulares sanguíneas (Tomado de Lodish *et al.*, 2000)

En la médula ósea, la hematopoyesis se presenta en asociación con células estromales, las cuales producen una amplia variedad de citocinas,

incluyendo al Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF) (Fibbe *et al.*, 1988; Migliaccio *et al.*, 1990). Las interacciones íntimas de célula a célula que se dan entre las células estromales y las células hematopoyéticas son indispensables para que la hematopoyesis se lleve a cabo con eficacia (Dexter *et al.*, 1977).

1.2 Células progenitoras hematopoyéticas (CPH)

Las CPH son células inmaduras con capacidad limitada de renovación y de habilidad para formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos, son también conocidas como células formadoras de colonias (CFC), localizadas después del nacimiento en la médula ósea; los diferentes subgrupos pueden ser distinguidos por su estadio de madurez o por su potencial de reconstitución. Un pequeño número de CPH da origen a progenitores de linaje específico que proliferan y maduran en la MO, pasando posteriormente a la sangre (Van Furt, 1993; Mayani *et al.*, 2003).

El proceso de proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), es altamente dinámico y se pueden originar también en relación a la tensión fisiológica del organismo tal como sangrado o infección (Van Oostveen *et al.*, 1999).

En la médula ósea, el número de CPH es muy bajo, generalmente representan entre el 0.01 y 0.05% de la población celular total. La presencia de las CPH es sumamente importante, ya que si por alguna causa éstas no existieran, se originaría una pancitopenia -ausencia de todas las células sanguíneas -. De una manera similar, si las CPH están presentes pero alteradas, se desarrollan líneas celulares anormales que condicionan una variedad de síndromes linfomielodisplásicos (Metcalf, 1988). Así mismo, a principios de 1980 se descubrió que las CPH también se encontraban en pacientes que habían presentado leucemia o linfoma en remisión, durante el período de recuperación, después de la administración de altas dosis de quimioterapia (Goldman, 1995); respecto a éste

hallazgo Richman *et al* sugieren que la quimioterapia induce movilización de las CPH de áreas extravasculares hacia la circulación.

Se ha observado en estudios realizados en humanos y en murinos, que la transfusión de sangre periférica (SP), es capaz de proteger a individuos receptores de dosis letales de radiación o de drogas citotóxicas, mediante la restauración de células sanguíneas formadas de CPH circulantes, sugiriendo que estas se encuentran presentes en las células mononucleares de la sangre periférica; esto demuestra el potencial de las CPH para reconstituir la hematopoyésis en individuos que presentan una disminución en el número de células sanguíneas debido a tratamientos citotóxicos. Así mismo se ha demostrado la presencia de células formadoras de colonias (CFC) (Prosper *et al.*, 1996; Udomsakdi *et al.*, 1992); de esta forma las CPH son esenciales para la recuperación de individuos receptores inmunocomprometidos, debido a que reconstituyen todos los linajes sanguíneos dentro de los que se encuentran los linfocitos B, monocitos y células dendríticas (Rondelli *et al.*, 1996). Las CPH expresan el antígeno CD34, que es una glicoproteína integral de membrana que funciona como un regulador de la adhesión celular hematopoyética a células estromales del microambiente (Mayani *et al.*, 2003); y ha sido usado como un marcador celular en estudios clínicos (Craddock, 2000).

1.3 Transplante de células hematopoyéticas

Por otra parte aunque el transplante de médula ósea ha sido ampliamente utilizado como un tratamiento terapéutico en enfermedades malignas y no malignas, es a partir de 1990 que las células progenitoras de la sangre periférica colectadas por aféresis, reemplazan grandemente al transplante de médula ósea, como una fuente de células tronco hematopoyéticas para el transplante autólogo (células del mismo individuo) (Lane *et al.*, 1995), alogénico (las células proceden de un hermano genéticamente diferente) (Martínez *et al.*, 1999), y transplante alogénico no relacionado (Petersdorf and Anasetti, 2005).

En los individuos donadores de CPH se evita el procedimiento de anestesia general, lo cual es de gran beneficio para alentar donación por donadores voluntarios no relacionados. Resultados preliminares de trasplantes de células tronco sanguíneas, indican una reconstitución hematopoyética más rápida después de terapia mieloablativa, comparado con las CPH de la médula ósea, debido a que las colectas de células movilizadas contienen un elevado número de células pluripotenciales de renovación propia, así como de células progenitoras de los diferentes linajes sanguíneos, lo que ayuda a una recuperación funcional más rápida de la médula ósea (Martínez *et al.*, 1999; Hidalgo *et al.*, 2004), ayudando así mismo a reducir costos. Por tal motivo, las células tronco colectadas de la sangre periférica de donadores a los que se les administró el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), se usan ahora como una alternativa para el trasplante de médula ósea.

Champlin *et al* (2000) sugirieron que el uso de las células tronco sanguíneas más que las de médula ósea, pueden mejorar los resultados de trasplantes alogénicos en pacientes con leucemia aguda avanzada o leucemia mielocítica crónica, al menos durante el primer año después del trasplante. Se han obtenido resultados similares en pacientes con leucemia aguda en primera remisión, y en pacientes con leucemia mielocítica crónica en primera fase crónica, esto debido a una recuperación más rápida de neutrófilos y plaquetas.

La movilización de la CPH es un fenómeno complejo que involucra la contribución coordinada de moléculas de adhesión, citocinas endógenas, proteasas y varias vías de señalización (aún no identificadas) (Hidalgo *et al.*, 2004). Así el proceso implica una modificación de las interacciones entre células hematopoyéticas y elementos estromales (células y moléculas de la matriz extracelular), migración de las células hematopoyéticas a senos de la médula ósea y el egreso a través de la capa endotelial (Mayani *et al.*, 2003).

De esta forma desde el punto de vista clínico la movilización de las células progenitoras de médula ósea hacia la sangre periférica es muy importante, ya que se obtiene un número elevado de CPH (Lane *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 1996) lo que reduce la mortalidad y morbilidad tempranas (no en todos los casos) en comparación con los resultados de trasplantes de médula ósea (De Fabritiis *et*

al., 2001); Sin embargo puede existir el riesgo de la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) o del efecto leucemia contra injerto, debido a la presencia de linfocitos T presentes en la colecta de CPH del donador inmunocompetente y transplantados al receptor inmunosuprimido (Burt, 1996). En muchos estudios, la incidencia de GVHD aguda con trasplantes de células tronco sanguíneas es similar a lo reportado con trasplantes de médula ósea; a nivel celular algunos autores reportan que en donadores estimulados con el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Recombinante Humano (rhG-CSF) la proliferación linfocitaria se ve inhibida, debido a acciones inmunoregulatoras induciendo el fenotipo conocido como “activación parcial linfocitaria” (Rutella *et al.*, 1997 y 1998), lo que disminuye el riesgo de GVHD.

Por su parte Volpi *et al* (2001) describieron el daño celular inmune a largo plazo de las células T en pacientes con haplotipo HLA (Antígeno leucocitario humano) mal apareado, tratados con el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF) después del trasplante con CPH; con el objeto de reducir el período de neutropenia y mejorar el injerto después del trasplante. Afirman que la desregulación inmune a largo plazo puede ser significativa, como muestra el hecho de la reducida capacidad de las células T para hacer frente a las infecciones ocasionadas por hongos. Los autores también muestran que el tratamiento con G-CSF tiene una influencia negativa sobre las funciones inmunes *in vitro* en donadores normales de CPH. El reporte de Volpi indica que los efectos inmunológicos del G-CSF deben ser monitoreados a largo plazo, y nuevos estudios prospectivos son necesarios para permitir una evaluación de los beneficios a corto plazo contra los riesgos potenciales a largo plazo

1.4 FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS

La defensa frente a organismos extraños, como virus o bacterias, está mediada por una inmunidad innata y una específica (o adaptativa). Las fases efectoras de ambos tipos de inmunidad están mediadas en gran medida por unas glicoproteínas con actividad hormonal llamadas citocinas.

De acuerdo a sus características funcionales las citocinas se dividieron en tres categorías: 1) *mediadores y reguladores de la inmunidad innata*, cuya producción por los macrófagos mononucleares es estimulada por agentes infecciosos y estimulan o inhiben las reacciones inflamatorias, 2) *mediadores y reguladores de la inmunidad específica*, que se producen como respuesta al reconocimiento por los linfocitos T de antígenos específicos y que sirven para intensificar, focalizar y especializar las reacciones inflamatorias, y 3) *estimuladores de la proliferación y diferenciación de los leucocitos inmaduros*, que son producidos tanto por los linfocitos activados como por otras células. Varias citocinas pueden actuar en más de una de estas categorías. La mayoría de citocinas que estimulan la expansión y diferenciación de las células progenitoras de la médula ósea se denominan colectivamente factores estimuladores de colonias (CSF), porque se suelen analizar según su capacidad para estimular la formación de colonias celulares en cultivos de médula ósea. Estas colonias maduran en cultivos *in vitro* adquiriendo características de líneas celulares específicas. Sobre las células de la médula ósea actúan diferentes CSF, los nombres asignados a estos factores reflejan los tipos de colonias a que dan origen. Se conocen cuatro clases de CSF: Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF), Factor Estimulador de Monocitos (M-CSF ó CSF-1) , éstos son citocinas producidas por células T activadas, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos del estroma que actúan sobre la médula ósea aumentando la producción de leucocitos inflamatorios. Además el G-CSF actúa como una hormona endócrina, generada en los focos inflamatorios, que moviliza neutrófilos desde la médula ósea para reponer los que se consumen en las reacciones inflamatorias. El GM-CSF es también un factor activador de macrófagos y favorece la diferenciación de las células de Langerhans a células dendríticas. La Interleucina-3 (IL-3), también conocida como Factor estimulador de colonias de líneas múltiples (Multi-CSF), es un producto de las células T CD4+ que actúa sobre los progenitores más inmaduros de la médula ósea y favorece la expansión de células que se diferencian en todos los tipos de células maduras que se conocen (Abbas *et al.*, 2000) (Tabla 1).

Los CSF se dividen en factores de crecimiento multipotenciales y factores de crecimiento de linaje restringido, ejercen sus efectos celulares por interacción con los receptores de membrana de la célula blanco. Los receptores son importantes en la regulación de complejas interacciones entre diferentes factores de crecimiento, las células sanguíneas y de la médula ósea; en la presencia de niveles bajos del receptor los factores de crecimiento muestran sus efectos biológicos, las células hematopoyéticas expresan receptores simultáneos para varios factores de crecimiento, el número de receptores por célula es relativamente bajo, y la presencia de un tipo de receptor regula otros tipos de receptores presentes en la misma célula (Nicola, 1987).

Tabla 1. Características de los Factores de Crecimiento Hematopoyéticos.

Factor de Crecimiento	Peso Molecular (Daltones)	Localización cromosómica	Célula blanco progenitora	Células blanco maduras
G-CSF	10-22	17q11.2-21	CFU-G	Neutrófilos
GM-CSF	14-35	5q23-31	CFU-blástica, CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-Eo, CFU-Meg, CFU-E.	Neutrófilos, Eosinófilos, Monocitos
M-CSF	70-90	5q33.1	CFU-M	Monocitos
IL-3	14-28	5q23-31	CFU-Blastos, CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-Eo, CFU-Meg, CFU-Baso, BFU-E.	Eosinófilos Monocitos
EPO	34-39	7q11-22	CFU-E, Tardía BFU-E, CFU-Meg.	Ninguno.

CFU = Unidad formadora de colonia; GEMM = granulocito, eritrocito, monocito, megacariocito; GM = granulocito y macrófago; Eo = eosinófilo; M = megacariocito; G = granulocito; M = macrófago; E = eritroide; Baso = Basófilo; BFU-E = unidad formadora de colonias eritroide; EPO= eritropoyetina (Tomada de Groopman *et al.*,1989)

1.5 Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF)

El G-CSF humano se purificó a partir de la línea celular 5687 de carcinoma de vejiga; es una molécula hidrofóbica que contiene 174 aminoácidos, con un sitio de glicosilación tipo "O" en la treonina 133. El peso molecular varía dependiendo de si está glicosilado o no, el G-CSF glicosilado tiene un peso de 19, 600 daltones, y el no glicosilado pesa 18, 800. La glicosilación puede tener efectos significativos sobre la función del factor de crecimiento, ya que estudios *in vitro* sugieren que la forma glicosilada tiene una mayor efectividad a corto plazo sobre la proliferación de colonias granulocíticas y neutrófilos. *In vitro* el G-CSF glicosilado es más resistente a la degradación en suero, tiene mayor efectividad que el no glicosilado debido a la mayor afinidad por su receptor (Watts, *et al.*, 1997).

El G-CSF tiene la propiedad de regular la producción, proliferación, diferenciación y maduración de progenitores mieloides hacia granulocitos y monocitos/macrófagos (Kaplinsky *et al.*, 2003). Si se adiciona G-CSF natural o el recombinante humano (rhG-CSF), se observa un crecimiento de colonias celulares dependiente de la dosis, y a concentraciones mayores o iguales a 100 U/ml (1ng/ml) induce una proliferación óptima, principalmente de granulocitos neutrófilos (> 90%) (Goldman, 1995; Lieschke, *et al.*, 1992; Nagler, *et al.*, 1996; Van de Geijn, 2004). (Figura 2)

Los productos recombinantes del G-CSF humano más utilizados para uso clínico son el Lenograstim y el Filgrastim; el primero se obtiene a partir de células de ovario del hámster Chino (CHO) y está glicosilado en el mismo sitio que la molécula nativa; el segundo no está glicosilado y se obtiene de E. Coli. El gen para éste factor se localiza en la región q11.2-q21 del cromosoma 17 (Welte, *et al.*, 1990; Watts *et al.*, 1997).

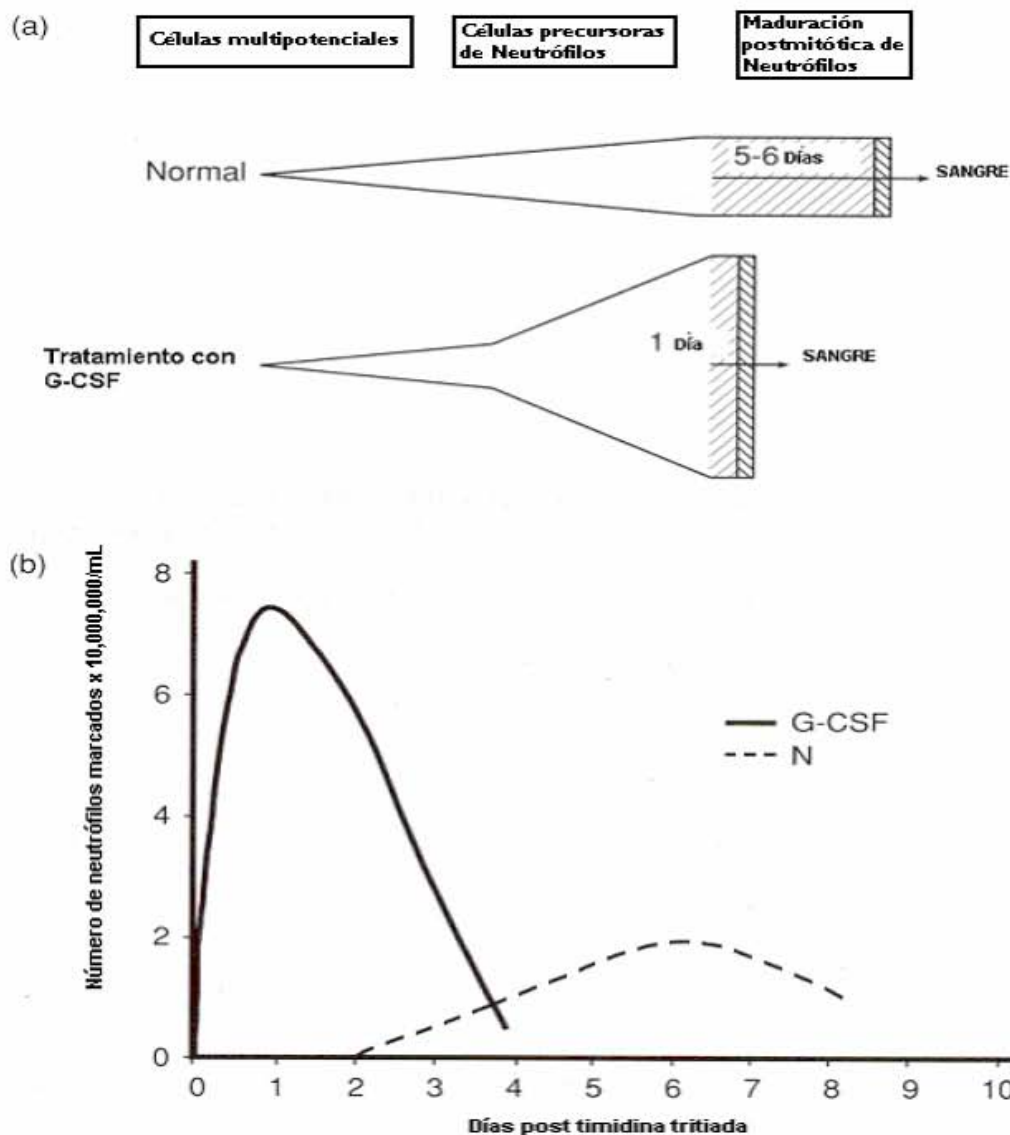


Figura 2 Efecto del G-CSF sobre la hematopoyésis en el hombre. De manera normal, se puede observar que la maduración de los neutrófilos a partir de una célula multipotencial ocurre en un período de cinco a seis días, mientras que cuando el G-CSF se administra exógenamente, el tiempo de maduración de neutrófilos es significativamente menor (un día) y se incrementa su concentración en sangre (a). En la gráfica (b) se observa la respuesta temprana y rápida de los neutrófilos al estímulo con el G-CSF con un pico máximo de concentración en el primer día de tratamiento (Tomada de Lord *et al.*, 1989).

El factor rhG-CSF (Filgrastim) tiene una absorción rápida y eficiente, y puede alcanzar su concentración máxima en suero en un lapso de 2-6 hrs. Las concentraciones en suero menores o iguales a 10 ng/ml se mantienen por espacio de 8-16 hrs., después de la aplicación de una dosis de 5 μ g/kg. Se ha

visto que cuando se administra de manera continua o repetida (24 horas) no se altera el metabolismo y la eliminación del mismo (Morstyn *et al.*, 1988).

El G-CSF recombinante no glicosilado tiene varios efectos biológicos, dentro de los cuales se encuentra que: a) estimula la formación y diferenciación de las colonias de granulocitos (Acquntella, 1995), b) influye en la maduración de neutrófilos estimulando su liberación desde la médula ósea hacia la sangre periférica, mejorando la función quimiotáctica y fagocítica, la liberación de superóxido, y la citotoxicidad mediada por anticuerpos (Steward, 1993; Acquntella, 1995.), c) actúa primariamente sobre las células precursoras de la médula ósea, permitiendo su diferenciación hacia células mieloides (Martínez *et al.*, 1999; Abbas *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 2001; Acquntella, 1995), d) Estimula la proliferación y diferenciación *in vitro* de ciertas líneas celulares tumorales y leucémicas mieloides (Welte *et al.*, 1990; Budel *et al.*, 1989; Acquntella, 1995), e) Induce proliferación y diferenciación de neutrófilos en sangre periférica (Possion *et al.*, 1996; Molineux *et al.*, 1990), f) Actúa sinérgicamente con IL-3 para estimular megacariocitos y colonias de blastos (Acquntella, 1995), g) en presencia de otras citocinas como GM-CSF, IL-3, y CSF-1, actúa sinérgicamente para incrementar el número de las células formadoras de colonias (Acquntella, 1995), h) ejerce un efecto pleiotrópico sobre diferentes tipos celulares del sistema inmune del huésped (Joshi *et al.*, 2001). (Figura 3)

1.6 Receptor del G-CSF

El receptor para el G-CSF es una cadena polipeptídica simple de 150 Kd, transmembranal y es miembro de la superfamilia de los receptores de las citocinas (Avalos *et al.*, 1990). Los receptores para el G-CSF son específicos, tienen una sola afinidad y se presentan en progenitores mieloides, granulocitos maduros, monocitos y algunos linfocitos T y B (Joshi *et al.*, 2001). El número de receptores en los neutrófilos en humanos aumenta ligeramente con la maduración de la célula. La unión del G-CSF a su receptor ayuda a una disminución en el número de receptores de superficie, así como a que el complejo receptor-G-CSF sea internalizado y degradado. La unión, la internalización y la degradación se

requieren para que el G-CSF actúe (Nicola, 1987) (Figura 4). En muchas células, este tipo de receptores activan la transcripción de genes específicos, al menos por las siguientes vías: a) la cinasa-C activa una cascada de proteínas cinasas que ayudan a la fosforilación y activación de una proteína reguladora unida al DNA; b) la activación de la cinasa-C ayuda a la fosforilación de una proteína inhibidora, que se activa y libera una proteína reguladora citoplásmica que migra al núcleo y estimula la transcripción de genes específicos (Alberts *et al.*, 1994). (Figura 5)

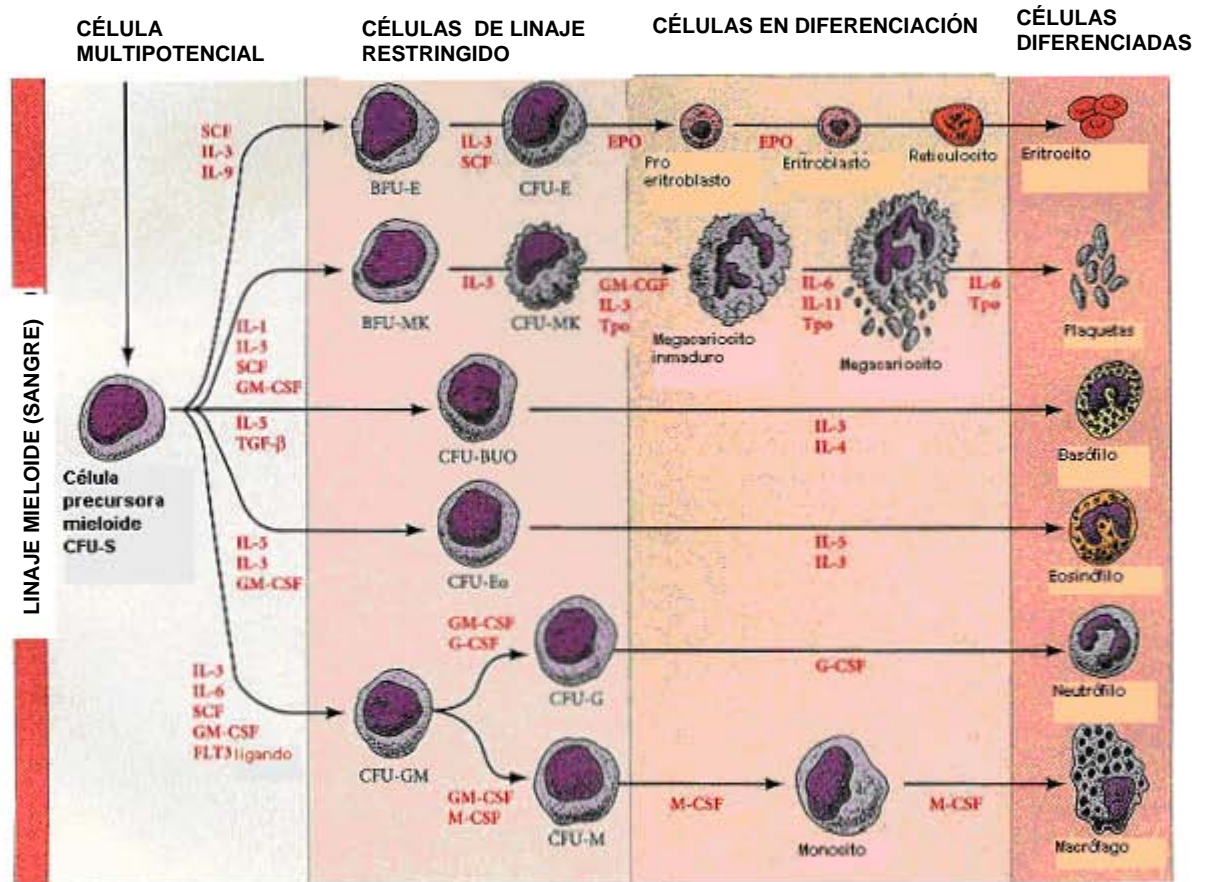


Figura 3. Interacción de G-CSF con otros tipos de citocinas durante la diferenciación hacia neutrófilos. (Tomado de Scott FG, 2000.)

La señal temprana generada en la membrana y en el citoplasma por el factor de crecimiento activado por el receptor, se propaga hacia el núcleo, lo cual resulta en una estimulación de la síntesis de DNA y división celular. La síntesis de DNA representa el evento tardío que ocurre dentro de las primeras 10 a 15 hrs. después de la inducción celular con el factor de crecimiento (Rakowicz-Szulczynska, 1994).

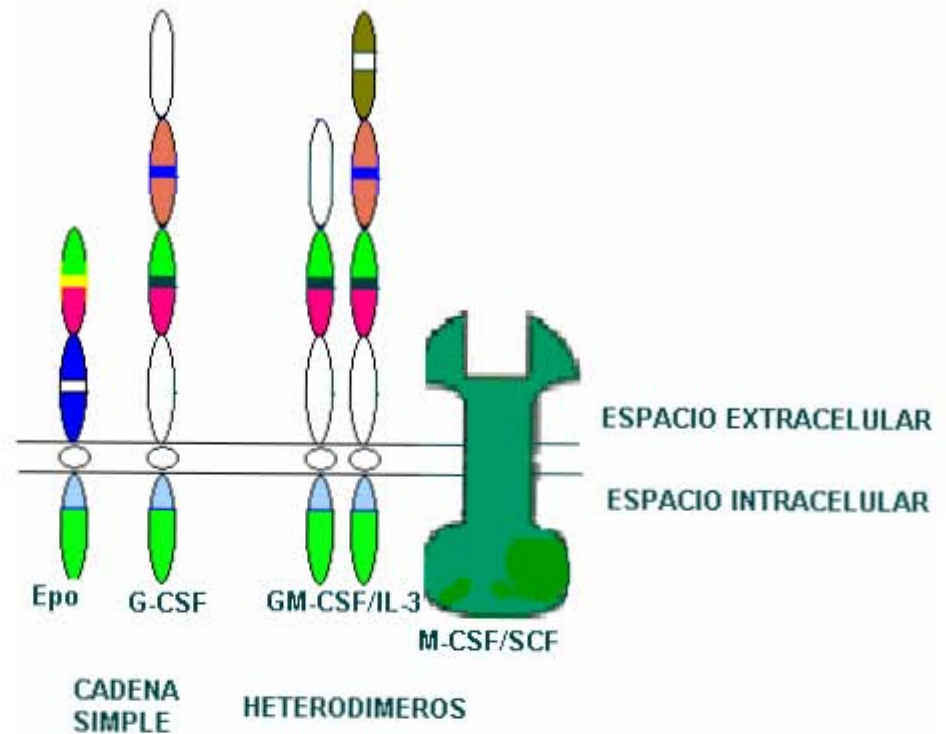


Figura 4. Superfamilia de receptores de las citocinas (Tomado de Alberts *et al.* 1994).

1.7 Aplicaciones clínicas

El G-CSF humano se secreta por células estromales, endoteliales, monocitos y fibroblastos, en respuesta a una variedad de estímulos celulares y humorales. Usualmente en individuos sanos las concentraciones son indetectables en el suero, pero en una neutropenia ó infección, la concentración en suero del G-CSF natural se incrementa significativamente. En un estudio realizado por Cebon et al (1994) se observó que los niveles del factor en sujetos afebriles era de 0.1 ng/ml mientras que en pacientes febriles se incrementó a 0.46 ng/ml. Estos datos sugieren que éste factor es un importante regulador fisiológico de la respuesta sistémica a neutropenia e infección.

Se ha visto que el rG-CSF no glicosilado es muy importante desde el punto de vista clínico, ya que permite una restauración de la hematopoyesis en enfermedades relacionadas con neutropenia secundaria a quimioterapia mieloablativa, drogas, y/o radiación (Gabilove y Jakubowski, 1989 y Acquntella, 1995); además, ayuda en la disminución de episodios febriles post-quimioterapia

de leucemias linfoides agudas y tumores sólidos (Acquntella, 1995). El uso del G-CSF ha disminuido la morbilidad de pacientes que recibieron quimioterapia (por mielosupresión reducida y mucositis) permitiendo un programa completo de terapia, al administrar grandes dosis de agentes antineoplásicos con o sin trasplante de médula ósea, o agentes limitantes de toxicidad hematopoyética (Gabrilove y Jakubowski, 1989); incrementa la proliferación de las defensas del huésped (principalmente neutrófilos) contra infecciones (Gabrilove y Jakubowski, 1989, Ganser y Karthaus, 1996); ayuda en la estimulación y producción de células efectoras con capacidad antitumoral (Gabrilove y Jakubowski, 1989).

Se ha observado en sistemas de cultivo de MO a largo plazo de dos y cinco semanas, (donde los elementos estromales forman una capa adherente en la que las células tronco se depositan y desarrollan la hematopoyesis, definiéndose posteriormente el número de colonias producidas por las células cultivadas) que la administración del G-CSF a donadores, moviliza mayormente a los progenitores primitivos de tres a cinco días después de la aplicación, mientras que los progenitores diferenciados incrementan su número después del cuarto día; los primeros están involucrados en la reconstitución de la MO, mientras que el segundo tipo celular prolifera y se diferencia poco después del trasplante, para poder defender al receptor de posibles infecciones. En consecuencia la colecta debe realizarse cuatro ó cinco días después de la administración del factor, porque el número de progenitores tanto primitivos como diferenciados es mayor en la circulación (Suzuki *et al.*, 1998).

Un estudio realizado por De la Rubia *et al* (2001) muestra que la movilización de las CPH por el rG-CSF, así como la cosecha de las células es segura y efectiva, tanto en donadores jóvenes como en adultos. En este estudio se llevó a cabo un seguimiento por más de un año, durante el cual no se observaron complicaciones. Por otra parte Besinger *et al* (1996), reportan un seguimiento durante cuatro años sin problema.

En general, los alodonadores toleran de manera adecuada la administración del factor y la leucoféresis, sin embargo en ocasiones pueden

presentar ligeras molestias como, fiebre, náusea, mareo y dolor de huesos durante el tiempo de administración (Nagler *et al.*, 1996 y Anderlini *et al.*, 1999). Hasta el momento no hay reportes contundentes de toxicidad (Hester *et al.*, 1995), en algunos casos se han presentado efectos adversos, que van de fatiga moderada a profunda, breves episodios de hipoxia (Grigg *et al.*, 1995 a), hiperventilación pasajera, presencia de un absceso perianal en un donador (Grigg *et al.*, 1995 b), y en otros se refieren hallazgos más graves, como la inducción de iritis aguda (Parkkali *et al.*, 1996), ruptura esplénica en otro (Becker *et al.*, 1997), artritis gotosa aguda y reacción anafilactoidea (Anderlini *et al.*, 1999). En cuanto a los donadores pediátricos se tiene poca experiencia, sin embargo, se reporta el caso de un donador de 11 meses el cual no presentó ninguna complicación después de la movilización (Possion *et al.*, 1996). Se ha observado que la movilización no se ve afectada por la edad o el sexo (Grigg *et al.*, 1995 b).

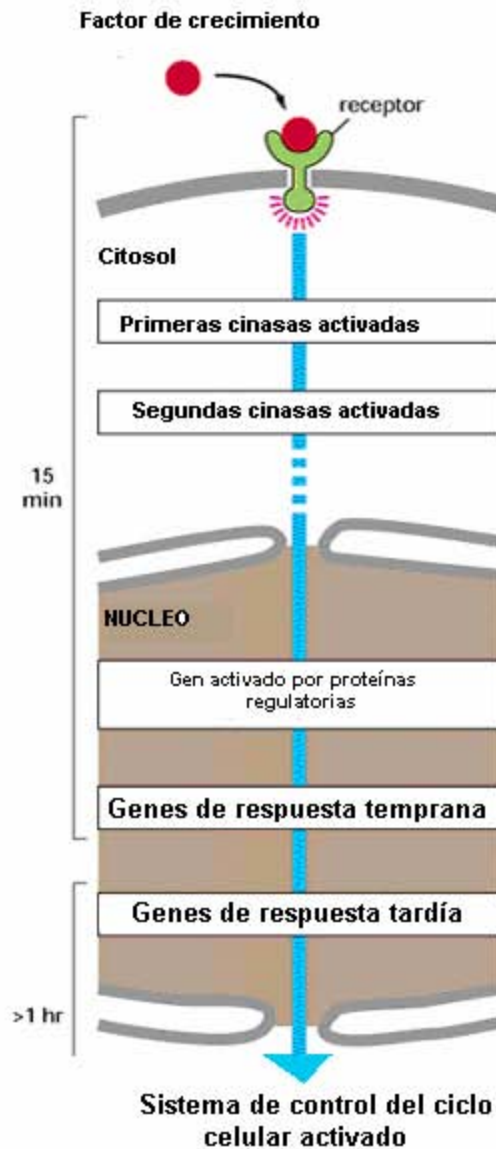


Figura 5. Vía de señalización para la estimulación de la proliferación celular por un factor de crecimiento (Tomado de Alberts *et al.*, 1994).

El uso de CPH movilizadas a la sangre con fines de trasplante tiene varias ventajas sobre células de la médula ósea (MO); primero, ésta técnica mejora la aceptación del donador, evitando los riesgos de la anestesia general y el aspirado de la MO; segundo, el tiempo de hospitalización es corto, reduciendo costos y

tercero se asocia con una reconstitución hematopoyética acelerada (Lane *et al.*, 1995 y Tjonnfjord *et al.*, 1994) además de una cosecha de células facilitada (Rondelli *et al.*, 1996). El número de CPH que se obtienen varía, pero generalmente se obtiene un promedio de 2 a 4 x10⁶/Kg. de peso corporal (De la Rubia *et al.*, 2001; De Fabritiis *et al.*, 2001). Estas colectas contienen un número masivo de células T, (que son independientes del número obtenido de CPH) que pueden agravar el desarrollo de la enfermedad injerto versus huésped (GVHD), sin embargo, el método más usado para disminuir ésta enfermedad es el uso de drogas inmunosupresivas, las cuales son administradas en pacientes con trasplante alogénico para minimizar la GVHD. En un estudio realizado por Chao y Blume (1992) se demostró que los pacientes que recibieron inmunosupresores tales como: prednisona, ciclosporina y metotrexate, experimentaban una duración mayor de aplasia medular, en comparación con aquellos que recibieron sólo prednisona y ciclosporina. Por otra parte Schmitz *et al.*, (1998) y De Fabritiis *et al.*, (2001) reportaron sólo el uso de ciclosporina y metotrexate como profilaxis para la GVHD.

2. ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

En el humano, las células tienen un número específico de cromosomas, las células somáticas presentan 46 y las gaméticas 23. La organización y el número de genes en los cromosomas de un organismo es el mismo de una célula a otra; el número cromosómico y la típica organización de los genes se mantienen en todos los miembros de la misma especie. De manera normal, los cromosomas mantienen la forma y la estructura característica de su especie, sin embargo pueden presentarse cambios numéricos y/o estructurales conocidos como aberraciones cromosómicas. Estas irregularidades pueden tener consecuencias para el individuo que las posee o para su descendencia (Sack, 2002); cuando el individuo tiene una alteración cromosómica desbalanceada (con ganancia o pérdida de material genético) su fenotipo es anormal y puede tener alteraciones en su reproducción; si la aberración es balanceada (el complemento cromosómico está completo), en las células germinales puede haber cambios en la segregación

meiótica que den lugar a malformaciones, abortos o alteraciones cromosómicas desbalanceadas. Las aberraciones cromosómicas estructurales ocurren cuando el material genético se cambia de tal forma, que las alteraciones son visibles en los cromosomas. Estos cambios pueden incluir rearrreglos entre uno o más cromosomas que pueden modificar su estructura.

Por otra parte, algunos cambios en la organización cromosómica se presentan de manera natural, como mecanismos de transformación en la expresión génica, frecuentemente como parte del programa de desarrollo (Rusell, 1992).

La frecuencia de las alteraciones cromosómicas constitucionales varía dependiendo de la población estudiada: en los abortos espontáneos se ha encontrado una frecuencia de 50 al 60%, en mortinatos del 5%, en recién nacidos vivos del 0.63% (de éstas, 2/3 son autósomicos y una porción similar determina al nacimiento repercusiones fenotípicas evidentes), en deficiencias mentales del 20%, en parejas con pérdidas gestacionales diversas del 8% y en varones infértiles 6%. En contraste, en la población general, la posibilidad de que una alteración cromosómica se transmita de una generación a otra es baja, pues la mayor parte ocurre *de novo* en cada generación (Guizar-Vazquez, 2001).

2.1 Aberraciones inestables

La presencia de aberraciones inestables afecta de manera grave a la mayoría de las células que las adquieren alterando la división de los cromosomas y en consecuencia la viabilidad celular. Dentro de éste grupo se encuentran: rompimientos cromosómicos y cromatídicos, fragmentos, dicéntricos, anillos e intercambios cromatídicos, figuras radiales (Carbonell *et al.*, 1996; Navarrete *et al.*, 1975) (Figura 6)

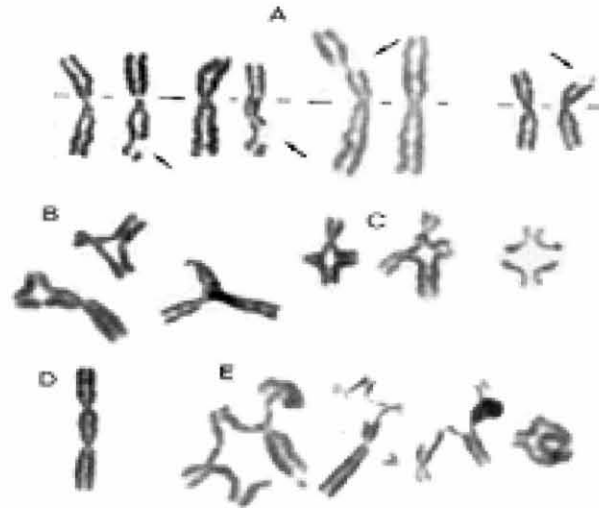


Figura 6. Aberraciones cromosómicas inestables A) Rupturas cromatídicas B) Figuras trirradiales C) Figuras tetrarradiales D) Cromosoma dicéntrico E) Pentarradio y figuras radiales con rupturas cromatídicas.

Estas aberraciones cromosómicas se pueden generar por acción de agentes mutagénicos y/o clastogénicos que alteran al DNA. Los diversos tipos celulares y estadios muestran diferentes respuestas a agentes clastogénicos aún dentro del mismo organismo (Therman, 1986); estos agentes pueden romper a los cromosomas en cualquier fase del ciclo celular –G1, S, G2 – durante la mitosis o la meiosis, alterando una o dos cromátidas.

Un *rompimiento* es una interrupción en la continuidad de la doble hélice del DNA, puede presentarse de manera cromatídica o cromosómica. Si el rompimiento se produce durante la fase G1 y no es reparado en la fase S, es visible en ambas cromátidas (rompimiento cromosómico) en la siguiente metafase. Cuando el rompimiento toma lugar durante la fase G2 involucra sólo a una de las dos cromátidas, y es llamado rompimiento cromatídico. Un rompimiento simple origina un cromosoma deleciónado, y un fragmento acéntrico (sin centrómero) que puede perderse en la siguiente mitosis, o los fragmentos acéntricos pueden estar

incluidos en un núcleo hijo y replicarse, observándose como fragmentos dobles en la metafase siguiente. Dos rompimientos en el mismo cromosoma da como resultado, la formación, ya sea de un anillo céntrico y un fragmento acéntrico, o un anillo acéntrico y una delección intersticial.

Cuando ocurre un rompimiento en una cromátida de dos cromosomas se puede formar *intercambios cromatídicos* entre los dos cromosomas, llamados figuras radiales. Estas aberraciones inestables pueden tener uno ó más ejes, de tal manera que existen figuras trirradiales, tetrarradiales ó pentarradiales; las más comunes son la figuras tetrarradiales y en las trirradiales el punto de división frecuentemente es un sitio frágil. Se han propuesto tres mecanismos para su formación: endoreduplicación parcial (un segmento de un cromosoma replica dos veces, mientras que el resto replica una vez), un fragmento cromatídico que permanece asociado con una cromátida hermana en anafase, o un cromosoma roto se inserta en un rompimiento cromatídico (Therman, 1986; Miller y Therman, 2001).

Los factores genéticos son una de las principales causas de rompimiento cromosómico; esto se observa en síndromes de inestabilidad cromosómica con herencia autosómica recesiva que por lo general son raros, en los que las enzimas de reparación del ADN son defectuosas; más comunes son las mutaciones somáticas en varios genes que son una causa importante de progresión de tumores. Las características inherentes del genoma, tal como los elementos transposables, secuencias repetidas, duplicación de genes (incluyendo pseudogenes) y sitios frágiles también predisponen a aberraciones estructurales.

Entre las alteraciones relativamente simples de los cromosomas individuales están las roturas cromatídicas o cromosómicas que implican la pérdida de alguna parte del cromosoma, y son conocidas como *delección*, que es la ausencia física de alguna región, identificable por el cambio de la longitud del cromosoma y la pérdida del patrón de bandas en la microscopía de luz, o las secuencias de una región de ADN, utilizando la técnica de hibridación *in situ* (FISH). Las delecciones pueden ocasionar problemas graves. La pérdida de tres

bases contiguas puede dar lugar a la pérdida de un solo codón para un aminoácido (como ocurre en las mutaciones más comunes de la fibrosis quística), o afectar dos codones contiguos. No obstante, la pérdida de tres bases en una hilera (o cualquier múltiplo de tres), hace que el marco de lectura del gen se mantenga intacto. La pérdida de diferentes números de bases destruye el marco de lectura de tripletes y causa una completa alteración de la proteína producida.

La pérdida de un fragmento cromosómico implica a su vez la ausencia de genes situados en esa región. Para los autosomas, esto significa que el individuo es haploide para los genes de las regiones perdidas (en oposición al número diploide complementario de información normal); en general la copia residual de la información genética está intacta en el otro cromosoma. Para los cromosomas sexuales, en el caso del varón XY, la delección del cromosoma X tiene consecuencias muy graves debido a que no existe otro cromosoma X que tenga la copia de la región pérdida, por lo que generalmente los hombres con delección X presentan manifestaciones clínicas, mientras que en las mujeres pasan inadvertidas aunque porten la misma delección, dado que tienen otro cromosoma X (Sack, 2002). Las pequeñas deleciones tienen una amplia distribución y las grandes deleciones tienden a agruparse en áreas particulares del genoma originando síndromes clínicos característicos. Algunos sitios del genoma son susceptibles a los rompimientos produciendo deleciones y duplicaciones, reflejando un origen particular. Así por ejemplo, muchos pacientes con el síndrome Smith-Magenis tienen el mismo marcador genético delecionado. Recientemente se han identificado microdeleciones con la ayuda de la técnica de hibridación *in situ*. (Miller y Therman, 2001).

Los *fragmentos* son verdaderas fracturas con desplazamiento de las porciones cromosómicas, o la presencia de pequeños fragmentos cromosómicos llamados “minutas”. El rompimiento puede ser cromatídico o cromosómico. Son más fáciles de distinguir que las aberraciones de un rompimiento, pero son mucho más raras. Pueden ser acéntricos (sin centrómero) o céntricos (con centrómero). Si el fragmento acéntrico se pierde en la división mitótica la supervivencia del embrión es extremadamente difícil. (Miller y Therman, 2001).

Otra aberración inestable es el cromosoma en *anillo* que no es muy común. En alguna ocasión el fenotipo del cromosoma en anillo puede ser anormal y producir retraso mental severo. Pero existen excepciones; se han encontrado personas heterocigotas para el cromosoma 21 en anillo o el 22 que presentan un fenotipo enteramente normal. Existen dos tipos de cromosoma en anillo: a) El modelo clásico de formación es el rompimiento en ambos brazos del cromosoma, con fusión de los puntos de fractura que permanecen "pegajosos" y la pérdida de los fragmentos distales. Resultando, así mismo, una monosomía parcial del brazo corto distal y una del brazo largo distal. b) El otro tipo de anillo involucra la fusión de telómero a telómero y lo que generalmente conduce al fenotipo anormal es la segregación del anillo durante la división celular, que puede producir anillos entrelazados, con formas alteradas, debido al intercambio de cromátidas hermanas durante el ciclo celular después de la mitosis. Así las células hijas originadas de la mitosis son parcial o totalmente aneuploides para el cromosoma en cuestión - "mosaicismo dinámico"- . Estas células pueden morir y algunas, sin embargo, sobreviven en el estado de mosaico y presumiblemente realizan una contribución desfavorable al fenotipo. Los cromosomas en anillo son inestables tanto en mitosis como en meiosis, y frecuentemente se pierden, ya que tienen notorias dificultades durante la mitosis cuando las cromátidas hermanas intentan separarse. Las técnicas de "pintado de cromosomas" y la de FISH ayudan a reconocer las secuencias que constituyen estos anillos (Miller y Therman, 2001; Gardner y Sutherland, 1989).

El cromosoma *dicéntrico* como su nombre lo indica, es aquel que tiene dos centrómeros y que presenta por lo mismo, un comportamiento especial en la meiosis, ya que se originan puentes de tensión en la anafase cuando cada centrómero tiende a migrar hacia un polo diferente. Se forman así roturas a distintos niveles en la región intercentromérica del cromosoma anormal. El dicéntrico puede resultar de una translocación de cromosomas no homólogos o de una translocación de las dos cromátidas del mismo cromosoma (Guizar, 2001). Dos factores permiten la continuidad de un cromosoma dicéntrico: si los dos centrómeros están cercanos como en la translocación robertsoniana (entre cromosomas acrocéntricos), el cromosoma funciona como un monocéntrico. Sin

embargo, el segundo y más importante, es la habilidad del cromosoma dicéntrico humano de inactivar un centrómero. Los cromosomas dicéntricos se originan a través de una translocación recíproca en la fase de G1, o a través de la segregación de un cuadrirradial adyacente (Therman, 1986) (Figura 6D)

2.2 Aberraciones estables

A diferencia de las aberraciones inestables que tienen un efecto letal sobre las células, las aberraciones estables no interfieren con la división mitótica de los cromosomas y permite a la célula sobrevivir. Dentro de éstas se encuentran: inversiones peri y paracéntricas, inserciones, pequeñas deleciones, y translocaciones recíprocas o no, que pueden escapar a la detección cuando son usadas técnicas citogenéticas sin tinción diferencial (Carbonell, 1996) (Figura 7).

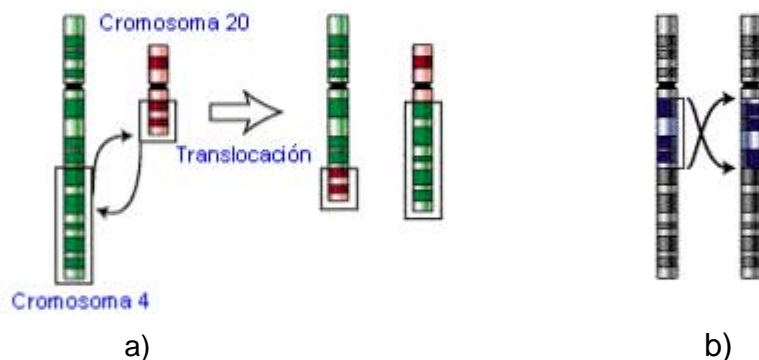


Figura 7. a) Translocación; b) Inversión paracéntrica.

Una inversión es el cambio del orden lineal u organización de secuencia en una determinada región del cromosoma. La información de una región puede estar invertida, de manera que el orden de los genes y regiones cromosómicas desde el punto de vista físico está invertido. Se conocen dos tipos: Si dos rompimientos toman lugar en el mismo brazo y los segmentos rotos se reúnen con el cromosoma en una orientación invertida se produce una inversión paracéntrica, sin cambio en la posición del centrómero. Si el rompimiento ocurre en cada brazo y el segmento entre los rompimientos es reunido en una orientación invertida, se produce una inversión pericéntrica. Aunque la información genética puede estar

intacta, dicha alteración – *inversión* – puede modificar las regiones de control y en los puntos de ruptura y unión, interrumpir secuencias importantes (e incluso los genes mismos). Por supuesto, la presencia de una inversión modifica el proceso de apareamiento durante la meiosis (Sack, 2002).

Mientras que la delección requiere de uno o dos rompimientos, y la inversión de dos, las *inserciones* son necesariamente el resultado de tres rompimientos. Consecuentemente son considerados más raros que las aberraciones que involucran uno o dos rompimientos. Esta aberración implica el desplazamiento total de información genética fuera de su región (intracromosómica), y aún su movilización hacia otro cromosoma distinto (intercromosomal). Este tipo de irregularidades puede afectar el control, y también hace posible que aparezca interrupción de genes en los puntos de inserción (Therman, 1986; Sack, 2002).

Diversos tipos de aberraciones cromosómicas se deben a la reorganización de grandes porciones de los cromosomas, en ocasiones brazos enteros de los mismos. Dentro de estas aberraciones se encuentran la *translocación*, que consiste en el paso de material genético de un cromosoma a otro. Las translocaciones robertsonianas tienen lugar entre cromosomas acrocéntricos. Por lo regular, no hay consecuencias fenotípicas de la pérdida de información genética debido a que los brazos cortos contienen repeticiones de los genes para el RNA ribosomal. Este fenómeno crea productos de gran longitud y son fácilmente identificables. Hay otro grupo de translocaciones en el que todo o una parte de un cromosoma se intercambia con otro, esto es, hay intercambio recíproco de secuencias entre un cromosoma y otro, lo cual produce muchas veces dos cromosomas anormales que son difíciles de distinguir con las técnicas convencionales. Las técnicas de Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) y el pintado de cromosomas pueden ayudar a definir con mayor detalle el tipo de translocación. Es evidente que dichas alteraciones de la estructura física pueden afectar el control y la integridad de grandes porciones de información genética (Salamanca GF, 1990)

Las anomalías cromosómicas causan complicaciones poco habituales durante la meiosis. Por ejemplo, es posible que un individuo con una translocación robertsoniana equilibrada (quien posee copias diploides de toda la información genética) tenga un aspecto clínico normal. Sin embargo, puede producir gametos desbalanceados en los procesos de apareamiento y recombinación en la meiosis; esto podría generar en su descendencia alteraciones cromosómicas que pueden ser muy graves y en ocasiones fatales. Por consiguiente, la presencia de aberraciones estructurales (aún cuando no se detecten), dada su importancia para el desarrollo de los individuos afectados, induce casi siempre manifestaciones clínicas de infertilidad y/o abortos espontáneos recurrentes. En ocasiones, las translocaciones cromosómicas y otras irregularidades se detectan sólo después de encontrar problemas obstétricos, lo cual concede relevancia al cariotipo como parte de los estudios solicitados en caso de esterilidad. Aproximadamente 4% de los abortos espontáneos durante el primer trimestre de la gestación se relaciona con el diagnóstico de alteraciones cromosómicas desequilibradas (Sack, 2002).

2.3 Aberraciones cromosómicas como indicadoras de daño

El papel de la citogenética en la investigación de exposición a mutágenos es de suma importancia, ya que diversas sustancias tóxicas y la radiación pueden dañar el material genético originando: mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas, cada una de ellas con su potencial específico para causar daño.

Las aberraciones pueden ocurrir de manera espontánea o inducida por factores externos químicos, físicos o biológicos. La naturaleza del daño al ADN o de la lesión va a depender del mecanismo de acción del agente involucrado: la radiación ionizante y la bleomicina causan rompimiento al ADN de cadena doble y sencilla, la radiación ultravioleta de onda corta induce la formación de dímeros de pirimidina y los agentes alquilantes inducen alquilación de las bases como la adición de grupos metilos. Los agentes alquilantes bifuncionales tales como la mitomicina C ó el metoxipsoralen activado con la luz ultravioleta de onda larga también, originan entrecruzamientos intra e inter hebras (crosslinks) y la acriflavina o proflavina se intercalan en los pares de bases de la doble hélice. Algunas infecciones por virus inducen daño cromosómico, el cual puede variar desde

afectar a un solo cromosoma con rompimientos cromatídicos, hasta rearrreglos múltiples o pulverización total del complemento cromosómico (Natarajan *et al.*, 1990).

La mayoría de las sustancias químicas mutagénicas o carcinogénicas interactúan con el ADN celular y son inductores de daño cromosómico en las células de muchas especies.

Existen otros factores mutagénicos internos o endógenos, que son intrínsecos a la vida celular misma, y que pueden originar daño al ADN y a la célula tales como: errores en la replicación y reparación del ADN, radicales libres y oxidantes originados del metabolismo, transposones y los procesos de metilación que pueden fallar (Guízar-Vázquez, 2001).

El uso de ensayos citogenéticos permite la observación directa del daño cromosómico ocasionado por genotóxicos, para esto es útil realizar ensayos *in vivo*, que consisten en la examinación de células de animales completos (rata, ratón, y hámster) que han sido expuestos a genotóxicos (Rooney and Czepulkowski, 1994). El uso de cultivos *in vitro* es más común para tal efecto, ya que se tiene un sistema más controlado que *in vivo* (Anderson, 1993) También se usan insectos y plantas, tanto como bacterias, hongos y virus para pruebas de genotoxicidad.

El análisis de las aberraciones cromosómicas es ampliamente utilizado para evaluar: dosis de radiación, monitoreo poblacional por exposición a genotóxicos, pruebas químicas *in vitro* y en la investigación de síndromes de inestabilidad cromosómica.

El incremento en los efectos genotóxicos de una gran variedad de agentes xenobióticos, ha dado como resultado la necesidad de desarrollar y aplicar métodos para estudiar los cambios genéticos en células somáticas y germinales en una población específica. El tipo y grado de daño genético observado es determinado por la naturaleza del agente. El monitoreo de la población se apoya en el uso de los biomarcadores, que indican el efecto, la exposición, o la

susceptibilidad de un determinado genotóxico. A nivel citogenético se cuenta con biomarcadores, tales como: las aberraciones cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas y los micronúcleos (Rooney y Czepulkowski, 1994).

Los diferentes tipos y estadios celulares muestran diversas respuestas a agentes citotóxicos y genotóxicos. Se sabe que los mutágenos inducen tanto rompimientos cromosómicos como mutaciones génicas, cambios que en algunos casos pueden originar cáncer. Sin embargo existen algunos síndromes genéticos con predisposición a los rompimientos cromosómicos y con susceptibilidad al cáncer, como son la Ataxia telangiectasia, la anemia de Fanconi, el Xeroderma pigmentoso, el síndrome de Bloom, y la Incontinencia pigmentaria (Salamanca, 1990). Por ejemplo, pacientes con Ataxia telangiectasia son especialmente sensibles a los efectos de la radiación ionizante y drogas radiomiméticas. Esto es importante porque las dosis anticancerosas usuales de estos agentes son letales para ellos. La radiación ionizante y los tratamientos anticancerosos pueden también causar malignidades secundarias en algunos pacientes (Miller y Therman, 2001).

Se ha observado que los rompimientos espontáneos y rearrreglos de origen indeterminado ocurren frecuentemente en muchos cultivos celulares y personas, especialmente de edad avanzada. La incidencia de cambios estructurales inducibles también se incrementa con la edad. Los efectos aditivos de agentes que rompen el ADN, como los rayos cósmicos, la radiación médica u ocupacional (radiación ionizante, ultravioleta) drogas, infecciones virales o fiebres elevadas, probablemente son el motivo de algunos de los incrementos en el rompimiento cromosómico de personas con edad avanzada (Miller y Therman, 2001). En un estudio realizado en células en personas menores de 40 años, Kuhn y Therman (1979) encontraron un promedio de 0.8% de células con aberraciones cromosómicas estructurales (excluyendo gaps), mientras que en los individuos con una edad promedio de 55.8 años, observaron el 2.4% de las células con aberraciones cromosómicas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), en un período de un año se analizaron cariotipos de 10 individuos clínicamente sanos, que fueron tratados con G-CSF para movilizar CPH de la médula ósea a la sangre periférica, con el objeto de realizar trasplante alogénico. En 4 de ellos (40%) se observó un incremento en el número de aberraciones inestables (8 a 10%) (rupturas cromatídicas y cromosómicas), mayor a lo reportado en la bibliografía (5%) (Sandberg, 1993) lo cual sugirió que el G-CSF podía tener actividad clastogénica. Así mismo se observó un número importante de gaps. Este hallazgo es importante porque las células que se transplantan deben ser normales y libres de alteraciones cromosómicas. Hasta la fecha en la literatura no existen estudios a nivel cromosómico sobre el posible efecto clastogénico de éste factor. Por éste hecho es importante conocer su efecto a nivel citogenético, ya que sólo se han reportado estudios a nivel clínico sobre su efecto y sería peligroso para los donadores de CPH, así como para los individuos receptores que pueden en un momento dado estar recibiendo células con alteraciones cromosómicas.

4. OBJETIVOS

1. Determinar la actividad clastogénica del factor G-CSF en linfocitos T de sangre periférica en cultivo y en CPH colectadas de los donadores.
2. Comparar la frecuencia de alteraciones cromosómicas entre linfocitos T y CPH de los donadores, con el grupo control y con lo reportado en la literatura en individuos normales.

5. HIPÓTESIS

1. Si el factor G-CSF tiene actividad clastogénica, entonces al cultivar los linfocitos T de donadores estimulados *in vivo* con dicho factor, éstos presentarán un mayor porcentaje de alteraciones cromosómicas que los linfocitos T de los individuos sanos.

2. Las CPH colectadas del donador después del estímulo tendrán un porcentaje de aberraciones cromosómicas mayor que el observado en los cultivos de linfocitos T de los individuos sanos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Población de estudio

Se incluyeron a nueve individuos donadores de CPH y cinco individuos sanos como población control. Los donadores de CPH fueron seleccionados con base en la Norma Oficial Mexicana para la Disposición de Sangre Humana para fines terapéuticos (NOM-003-SSA2-1993), por el personal del Banco de Sangre del INCAN; cuatro donadores fueron del sexo femenino y cinco del masculino, las edades variaron de 15 a 50 años. Todos los donadores firmaron una carta de consentimiento informado para participar en el estudio (Anexo 1)

La población control estuvo formada por cinco individuos sanos que aceptaron participar de manera voluntaria al estudio, tres de sexo femenino y dos del masculino, con edades de 20 a 25 años.

A los donadores se les realizaron los siguientes estudios de laboratorio : Grupo sanguíneo, Biometría hemática, Química sanguínea, Tiempos de coagulación, determinación de Antígenos de Histocompatibilidad, Anticuerpos contra el virus de Inmuno Deficiencia Humana (VIH), Cultivo mixto de linfocitos, Antígeno de superficie de la Hepatitis B y Anticuerpos contra Hepatitis C; a los individuos controles sólo Biometría hemática y Química sanguínea. Todos respondieron a un cuestionario (anexo 2) que permitió saber si habían estado en contacto con agentes genotóxicos, así como conocer la historia médica familiar y ocupacional, hábitos, etc.

Con el objetivo de descartar la presencia de aberraciones cromosómicas estructurales constitucionales, se realizó estudio citogenético con bandas GTG en linfocitos de sangre periférica tanto de los donadores como de los controles.

6.2 Obtención de las muestras celulares (sp y cph)

Antes de la estimulación con el G-CSF

- Obtención de la carta de consentimiento informado y llenado de cuestionario
- Cultivo celular para cariotipo y aberraciones cromosómicas en SP
- Pruebas de laboratorio

Después de la estimulación con G-CSF (600 mg/24 hrs/5 días)

- Realización de cultivo celular para cariotipo y aberraciones cromosómicas en SP y CPH en el 4º día de estimulación (1ª coleta de CPH)
- 2ª colecta de CPH al 5º día de estimulación

A los donadores se les tomaron tres muestras celulares: sangre periférica completa antes y después de realizar el estímulo con el factor G-CSF, y la colecta de las CPH por medio de la técnica de aféresis.

El estímulo con el factor G-CSF se hizo mediante la aplicación intramuscular del mismo a una dosis de 600 mg/24 hrs durante 5 días. Al cuarto día del tratamiento, se obtuvo una muestra de sangre periférica para la realización del cariotipo y se procedió a efectuar la primera colecta de CPH por medio de aféresis. Se realizaron dos colectas de CPH: al cuarto y quinto día después del estímulo.

Para la obtención de las CPH se utilizó el aparato Fenwal CS-3000 Baxter programado para la separación de células mononucleares. Las venas centrales de los brazos del donador se conectaron al equipo por medio de dos catéteres: uno que sirvió como salida de la sangre para separar las CPH y el otro para el retorno de la sangre al donador. En total, por donador se movilizaron 7 litros de sangre periférica que se centrifugaron en el equipo para separar las células mononucleares; se obtuvieron aproximadamente 600 ml de la suspensión celular y se tomaron 2 ml en condiciones estériles para realizar todos los siguientes estudios de laboratorio: biometría hemática completa, determinación de anticuerpos monoclonales CD34+, densidad y viabilidad celular.

Las muestras celulares de las dos colectas de CPH de todos los donadores se congelaron a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ con dimetilsulfóxido para mantener la viabilidad de las células (Burt, 1996); se conservaron de ésta forma hasta que las CPH fueron infundidas al receptor.

6.3 Cultivos celulares

a) Siembra

Con las muestras sanguíneas heparinizadas, tomadas antes y después del estímulo con el factor G-CSF y con las de los individuos control se hicieron cultivos de linfocitos por duplicado, de la siguiente manera: se sembraron 0.5 ml de sangre en 5 ml de medio RPMI (Gibco, USA) suplementado con suero fetal de bovino al 10% (Gibco, USA) y 0.3 ml de fitohemaglutinina (Gibco, USA). Se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 hrs.

Con las CPH no se realizó cultivo celular, se hizo una cosecha directa para obtener células en metafase y analizar el posible daño al ADN.

b) Cosecha

Para detener las células en metafase, a todos los cultivos se les adicionaron 500 μl . de colchicina a una concentración de 0.001 g/ml y se incubaron durante 3 hrs a 37°C . Posteriormente se centrifugaron durante 8 min a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante, se agregó solución hipotónica (KCl, 0.075M) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los tubos se reincubaron durante 15 min; nuevamente se centrifugó 8 min a 1500 rpm, se desechó el sobrenadante y se fijaron las células con solución de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1) frío, dando varios cambios con la misma solución hasta obtener un paquete celular blanco y el sobrenadante transparente.

c) Elaboración de laminillas

Las laminillas se elaboraron por goteo y choque térmico. Unas laminillas se trataron con tripsina y se tiñeron con Giemsa al 5% (pH 6.8) para analizar el cariotipo con bandas GTG y otras sólo se tiñeron con Giemsa para realizar el análisis de aberraciones cromosómicas. Las preparaciones fueron codificadas por una persona ajena al estudio para realizar un análisis ciego.

d) Análisis citogenético

Para el análisis de los cariotipos con bandas GTG se analizaron 20 metafases. Para determinar el porcentaje de aberraciones cromosómicas por célula, por cada cultivo celular se revisaron 100 metafases cuantificando las rupturas cromatídicas y cromosómicas, fragmentos céntricos y acéntricos, anillos, dicéntricos, figuras radiales y gaps.

El análisis de las aberraciones cromosómicas en las CPH se realizó en un número pequeño de células, debido a que el número de metafases obtenido para cada uno de los donadores fue muy bajo y variable. Por esta razón se investigó el efecto del G-CSF sobre el potencial mitótico de las CPH colectadas, para lo cual se analizaron 2000 células para calcular el índice mitótico.

e) Análisis estadístico

Los promedios de cada grupo de aberraciones cromosómicas se analizaron por medio de la prueba de U-Mann Whitney.

7. RESULTADOS

El análisis de los estudios de laboratorio y de los cuestionarios aplicados a la población de estudio de este trabajo, reveló que tanto los donadores de CPH como los individuos control no presentaron patologías, alcoholismo, tabaquismo, drogadicción, ni antecedentes de contacto con compuestos o agentes que dañen el ADN; a la exploración física, todos los individuos que participaron en el estudio se consideraron personas sanas. Los valores obtenidos de los estudios de laboratorio en la población estudiada en este trabajo se encontraron dentro de los niveles normales. Los cariotipos con bandas GTG de los linfocitos de los donadores y de los controles fueron normales.

Los linfocitos de los individuos de la población control, mostraron un porcentaje de aberraciones cromosómicas que va del 2 al 5% (tabla I) y porcentajes de gaps del 4 al 15% (tabla II). Antes del estímulo con el factor G-CSF, los donadores presentaron porcentajes de aberraciones cromosómicas del 0 al 5% y después del estímulo de 0 a 4% (tabla III y IV), estos porcentajes no fueron significativamente diferentes a los observados en la población control; además, no se encontró diferencia significativa en los porcentajes de aberraciones antes y después del estímulo con el factor G-CSF. En cuanto a la presencia de gaps, tampoco se encontró diferencia en los donadores antes y después del estímulo con el G-CSF, los porcentajes promedio fueron 5.5 y 4.3 respectivamente (tabla V y VI).

En general, las aberraciones cromosómicas que se encontraron fueron rupturas cromatídicas y cromosómicas; también se observaron gaps, aunque no se consideran como aberraciones cromosómicas (Figura 8). Al analizar el tipo de aberraciones cromosómicas en los linfocitos de los individuos control sin estímulo de G-CSF *versus* los de los donadores antes y después del estímulo, se encontró que los controles presentaron un mayor porcentaje de rupturas cromatídicas (tabla I, III y IV), sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas; de

una manera similar, los donadores antes del estímulo con el factor, mostraron un incremento no significativo del porcentaje de rupturas cromosómicas en comparación lo observado después del estímulo (tabla III y IV).

En las colectas de CPH de los donadores se encontró que sólo en cinco de nueve individuos se obtuvo un número reducido de metafases, de mala calidad y muy cerradas, por lo que no fue posible evaluar las aberraciones cromosómicas (Tabla VII); cabe señalar que los tiempos de tratamiento con solución hipotónica durante la cosecha celular fue cinco veces mayor que el tiempo utilizado de manera rutinaria en los laboratorios y las metafases cuantificadas se encontraron en todo el contenido del paquete celular. Debido a esto, se analizó el índice mitótico (IM) en las CPH colectadas de los donadores y en los cultivos de linfocitos de la población control y de los donadores, para conocer si el factor estaba actuando como un agente citostático. El IM en las CPH fue cero en cuatro donadores y muy cercano a cero en los cinco restantes ya que el número máximo de metafases observado fue de 29 en todo el paquete celular. En los cultivos de linfocitos de los individuos control, el IM fue mayor que el encontrado en los linfocitos de los donadores antes y después del estímulo (tabla VIII y IX); a pesar de no existir diferencias significativas, en la tabla IX se puede observar que en 7/9 donadores hubo una ligera disminución del IM.

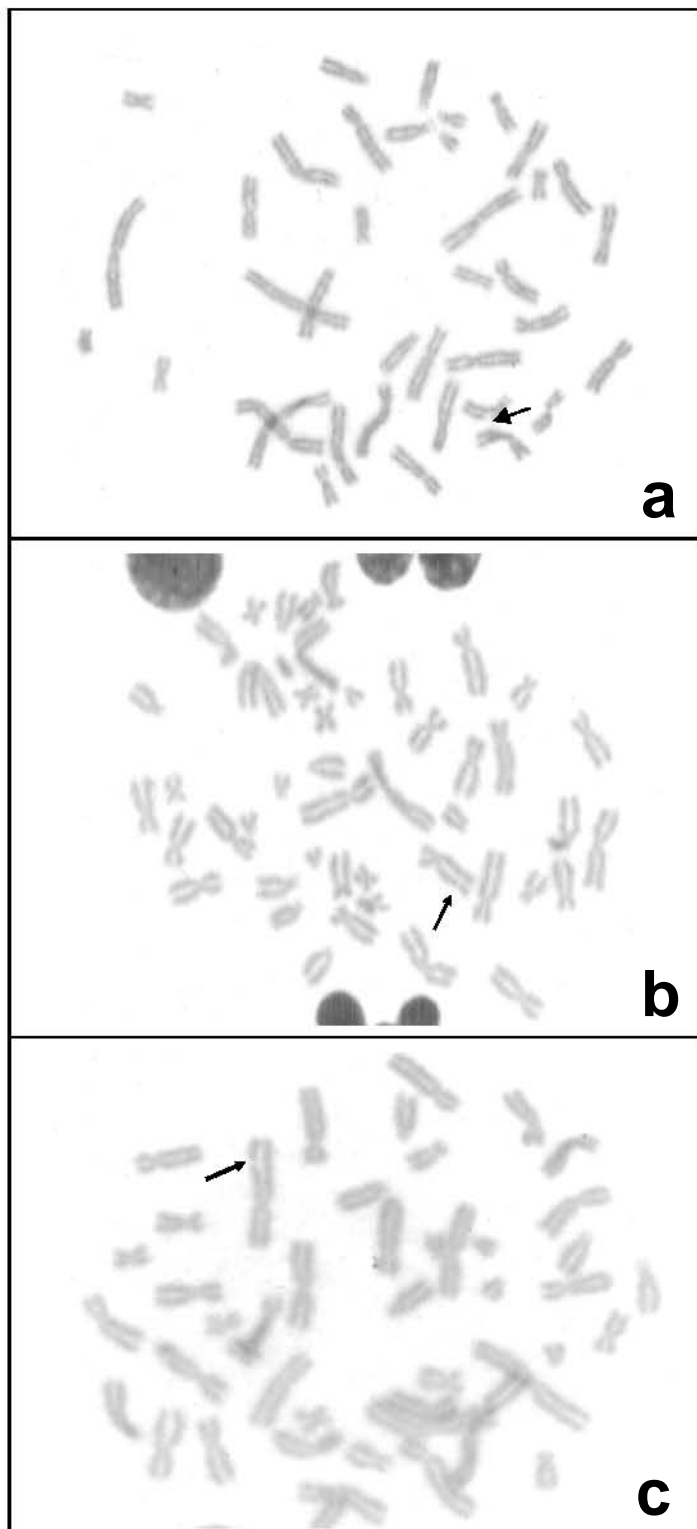


Figura 8. Tipo de aberraciones cromosómicas en células de los donadores. Las flechas indican un rompimiento cromatídico (a) y gaps cromatídicos (b y c).

TABLA I. PORCENTAJE DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN INDIVIDUOS CONTROLES

Individuo	Sexo	Edad (años)	% Rupturas cromatídicas	% Rupturas cromosómicas	% Total de Aberraciones
1	M	21	2	1	3
2	H	25	3	1	4
3	H	22	4	1	5
4	M	22	2	0	2
5	M	20	2	0	2
Promedio ± DE		22±1.9	2.6±0.89	0.6±0.54	3.2±1.3

M=Mujer, H=Hombre, DE=Desviación estándar

TABLA II. PORCENTAJE DE GAPS EN INDIVIDUOS CONTROLES

Individuo	Sexo	Edad (años)	% GAP cromatídico	%GAP cromosómico	% Total de GAPS
1	M	21	5	0	5
2	H	25	8	1	9
3	H	22	7	0	7
4	M	22	14	1	15
5	M	20	4	0	4
Promedio ± DE		22±1.9	7.6±3.9	0.4±0.5	8.0±4.4

M=Mujer, H=Hombre, DE=Desviación estándar

TABLA III. PORCENTAJE DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN DONADORES ANTES DEL ESTÍMULO CON EL FACTOR G-CSF

Donador	Sexo	Edad (años)	% Rupturas cromatídicas	%Rupturas cromosómicas	%Total de Aberraciones
1	H	19	0	1	1
2	H	39	0	0	0
3	H	29	0	1	1
4	M	36	0	4	4
5	H	15	2	1	3
6	M	19	2	0	2
7	H	50	0	1	1
8	M	50	2	3	5
9	M	29	0	1	1
Promedio±DS		31.7±13	0.6±1	1.33±1.3	2±1.7

M=Mujer, H=Hombre, DE=Desviación estándar

TABLA IV. PORCENTAJE DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN DONADORES DESPUÉS DEL ESTIMULO CON EL FACTOR G-CSF

Donador	Sexo	Edad (años)	%Rupturas cromatídicas	%Rupturas cromosómicas	%Total de aberraciones
1	H	19	0	0	0
2	H	39	0	0	0
3	H	29	1	0	1
4	M	36	0	0	0
5	H	15	4	0	4
6	M	19	3	0	3
7	H	50	1	0	1
8	M	50	1	0	1
9	M	29	1	1	2
Promedio ± DS		31.7±13	1.22±1.4	0.11±0.3	1.33±1.4

M=Mujer, H=Hombre, DS=Desviación estándar

TABLA V. PORCENTAJE DE GAPS EN DONADORES ANTES DEL ESTÍMULO CON EL FACTOR G-CSF

Donador	Sexo	Edad (años)	%GAP cromatídico	%GAP cromosómico	%Total de GAP
1	H	19	6	2	8
2	H	39	5	0	5
3	H	29	5	0	5
4	M	36	1	0	1
5	H	15	8	1	9
6	M	19	5	1	6
7	H	50	4	0	4
8	M	50	6	0	6
9	M	29	6	0	6
Promedio ± DS		31.7±13	5.11±1.9	0.44±0.7	5.55±2.3

M=Mujer, H=Hombre, DS=Desviación estándar

TABLA VI. GAPS EN DONADORES DESPUÉS DEL ESTÍMULO CON EL FACTOR G-CSF

Donador	Sexo	Edad (años)	%GAP Cromatídico	%GAP cromosómico	%Total de GAP
1	H	19	6	0	6
2	H	39	3	1	4
3	H	29	4	0	4
4	M	36	1	0	1
5	H	15	8	0	8
6	M	19	7	0	7
7	H	50	7	0	7
8	M	50	1	0	1
9	M	29	1	0	1
Promedio ± DS		31.7±13	4.22±2.9	0.11±0.3	4.33±2.8

M=Mujer, H=Hombre, DS=Desviación estándar

TABLA VII. NUMERO TOTAL DE METAFASES OBSERVADAS EN LAS DOS COLECTAS DE CPH DE LOS DONADORES

Donador	Sexo	Edad (años)	Número de metafases	
			1a. Colecta	2ª. Colecta
5	H	15	8	3
6	M	29	6	13
7	H	50	*	3
8	M	50	11	22
9	M	29	29	12
Promedio ± DS		34.6±15.2	10.8±10.9	10.6±7.9

M=Mujer, H=Hombre, DS=Desviación estándar

* No se obtuvo muestra de ésta colecta

TABLA VIII. ÍNDICE MITÓTICO DE LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS DE LOS INDIVIDUOS CONTROLES ESTIMULADOS CON PHA

No. De individuo	IM (%)
1	7.7
2	3.0
3	9.4
4	4.0
5	6.2
Promedio±DS	6±3

DS=Desviación estándar

TABLA IX. ÍNDICE MITÓTICO EN LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS DE LOS DONADORES ESTIMULADOS CON PHA, ANTES Y DESPUÉS DEL ESTÍMULO CON EL G-CSF

Donador	IM (%) Antes del estímulo	IM (%) Después del estímulo
1	3.5	1.2
2	2.1	1.0
3	1.8	7.5
4	2.4	2.8
5	3.6	1.1
6	4.2	1.4
7	4.5	2.6
8	3.0	1.6
9	3.2	1.9
Promedio±DS	3.1 ± 0.9	2.3± 2

DS=Desviación estándar

8. DISCUSIÓN

El trasplante de CPH periféricas obtenidas de donadores estimulados con factores de crecimiento hematopoyéticos, tales como G-CSF, ha llegado a ser una alternativa para el trasplante de médula ósea; algunos de los beneficios del uso de G-CSF son: un incremento en el número de células multipotenciales circulantes y de células progenitoras de múltiples linajes, además de movilizar células progenitoras de la MO hacia la sangre periférica. En el presente trabajo, se estudió el posible efecto clastogénico del factor G-CSF en los linfocitos de sangre periférica de donadores de CPH para el trasplante heterólogo. Los linfocitos de sangre periférica es un sistema de prueba sumamente validado y muy útil en la determinación de agentes que dañan al ADN celular.

En general, los linfocitos mostraron variabilidad en el porcentaje de aberraciones cromosómicas, tanto en los sujetos control como en los donadores, sin diferencia significativa. En otros estudios, se ha reportado la existencia de una correlación de aberraciones cromosómicas y edad, en la población estudiada de donadores aún en los individuos con 50 años no se encontró un incremento significativo en el número de aberraciones cromosómicas (Carbonell, 1996), todos se encontraron dentro de los valores normales. Es importante considerar que la población estudiada en este trabajo fue pequeña ya que el número de donadores de CPH en el INCan es relativamente bajo, debido al alto costo que implica el trasplante.

Los resultados del presente trabajo muestran, que el porcentaje de aberraciones cromosómicas en los linfocitos de los donadores antes del estímulo con el G-CSF fueron ligeramente mayores que después del estímulo con el factor, sin embargo no hay diferencias significativas respecto a lo observado en las aberraciones de los individuos control.

El análisis de estos porcentajes reveló que se encuentran dentro de los valores normales reportados en la literatura (Sandverg, 1993 y Kasura *et al*, 1995) y muestran que el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) no tiene actividad clastogénica, ya que no se observó incremento en el porcentaje de aberraciones después del estímulo con el factor. Hasta la fecha, no existen

reportes sobre el efecto clastogénico *in vitro* del factor G-CSF en los cultivos de linfocitos de SP.

En un estudio realizado por Kaplinsky y col. (2003) en la sangre periférica de donadores estimulados con el rhG-CSF observaron grandes neutrófilos multilobulados hipersegmentados que correspondían a células tetraploides, cuando analizaron las células de la colecta por aféresis encontraron un menor porcentaje de estas células poliploides; éstos autores sugieren que esta tetraploidía inducida por el factor está limitada a células maduras. En este trabajo, no se encontraron células poliploides, sólo en la colecta de CPH de tres donadores se observaron 1 o dos células hiperdiploides y en la SP de un donador se encontró una célula hiperdiploide. Por otra parte Tehranchi y col. (2005) encontraron que el tratamiento con factores de crecimiento como la eritropoyetina y G-CSF en pacientes con síndrome mielodisplásico reduce el porcentaje de células con cariotipo anormal e incrementa significativamente la proliferación de células con cariotipo normal; las células de los pacientes con síndrome mielodisplásico presentaban delección 5q, monosomía del cromosoma 7 y trisomía del cromosoma 8.

A nivel clínico se han reportado algunos efectos en los donadores tratados con el factor G-CSF, tales como dolor de huesos, mareos, fiebre ligera y esplenomegalia. El procedimiento de aféresis, en algunos casos, puede producir anemia ligera y trombocitopenia. Sin embargo, la mayoría de los donadores de CPH no presentan estos efectos secundarios.

De manera muy interesante, se observó que el factor G-CSF modificó la división celular de los cultivos de linfocitos de los donadores, ya que el índice mitótico disminuyó significativamente ($p < 0.05$). Al respecto, se sabe que el suero de individuos estimulados con el factor G-CSF, a diferentes concentraciones, suprime la proliferación linfocítica en cultivos estimulados con fitohemaglutinina, efecto conocido como “activación linfocítica parcial”, probablemente por la acción de mediadores inmunorregulatorios solubles secretados por los monocitos y los neutrófilos, como el receptor antagonista de la Interleucina 1 (IL-1ra) y lactoferrina. Esta respuesta funcional linfocítica es transitoria y reversible, la actividad

mitogénica de los linfocitos se restaura completamente 3 semanas después de la administración del G-CSF. Así mismo en estudios *in vitro* la proliferación se restaura por la adición de Interleucina 2 (Rutella, *et al*, 1998).

El efecto del factor sobre los cromosomas de las CPH no se logró valorar debido a la baja frecuencia y a la mala calidad de las metafases obtenidas; sin embargo, es muy probable que las CPH no presentaran una gran cantidad de daño, porque se hubiera encontrado un elevado porcentaje de daño cromosómico en las células maduras de la sangre periférica de los donadores y el porcentaje siempre fue similar al observado en la población control. Adicionalmente, no existen hallazgos reportados en la literatura mundial que indiquen que el G-CSF altera el genoma de las CPH. En estudios de perfiles de expresión génica en donadores movilizados con el factor G-CSF, al primer día se observaron diferencias de expresión en cientos de genes, pero esta respuesta fue temporal, ya que la expresión génica se restauró dos meses después del tratamiento (Hernández *et al*, 2005)

Por otra parte, también se ha reportado que la aféresis por sí misma abate la mitogénesis linfocítica (Talmadge *et al*, 1996, Rutella, *et al.*, 1997 y Rutella, *et a.*, 1998) y al parecer sería una condición celular benéfica para el receptor de un trasplante, ya que disminuiría los síntomas de la enfermedad injerto *versus* huésped. Estos hallazgos podrían también explicar el bajo índice mitótico observado en los cultivos de donadores estimulados con el factor y la escasez de metafases en las colectas de CPH.

Así mismo llamó la atención el elevado porcentaje observado de gaps en los individuos control, aunque no están considerados como AC, en comparación con los donadores antes y después del estímulo con el G-CSF, sin embargo estos resultados no son significativos

Finalmente, en este trabajo se mostró que el G-CSF no tiene efecto clastogénico sobre los linfocitos, ya que los porcentajes de aberraciones cromosómicas observadas fueron muy similares en los donadores antes y

después del estímulo con el factor. Pero por otra parte se observó un efecto poco común (mencionado anteriormente), en el cual el factor G-CSF ejerce una acción inmunoregulatoria sobre la mitogénesis, lo que origina una disminución en el índice mitótico tanto de los linfocitos como de las CPH.

9. CONCLUSIONES

1. El G-CSF no tiene efecto clastogénico sobre los linfocitos de los donadores, y puede utilizarse con seguridad en la movilización de células progenitoras hematopoyéticas sin ningún riesgo para los donadores.
2. El porcentaje de aberraciones cromosómicas de los linfocitos T de los donadores fue similar al observado en el grupo control.
3. El G-CSF por sí solo o en combinación con PHA disminuyó el índice mitótico de los linfocitos T en los donadores, por lo tanto esto es de beneficio para el receptor, porque disminuye el riesgo de presentar la enfermedad injerto contra hospedero.

10. Perspectivas

El uso del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas ha venido a sustituir al trasplante de médula ósea de manera importante, sobre todo por el procedimiento que éste implica en la obtención de CPH. No hay riesgo para los donadores y se obtiene un mayor número de células a transplantar.

El desarrollo de cultivos celulares que permiten una expansión de las células hematopoyéticas, permitirá en un futuro cercano el desarrollo de procedimientos en los cuales estas células sean administradas a los pacientes oncológicos. Así mismo el avance en estudios a nivel molecular permitirá el desarrollo de terapias génicas para una amplia variedad de enfermedades.

La obtención de CPH de otros tejidos, tales como el cordón umbilical viene a ser otra fuente importante de éstas células para trasplante, y la identificación en cultivos de células dendríticas y endoteliales tiene importantes implicaciones en el desarrollo de la inmunoterapia.

Aún hay muchas interrogantes respecto a la biología y trasplante de las CPH esperando ser contestadas, y viendo el avance en la investigación de este campo se esperan respuestas a corto plazo.

11. Anexos

Anexo 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Determinación de la inducción de aberraciones cromosómicas por el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF) sobre linfocitos T y Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) de donadores”

Fecha.....

Nombre.....

Edad.....

1.- El que suscribe voluntariamente acepta donar muestra de células progenitoras hematopoyéticas y 5 ml. de sangre para ser utilizadas para propósitos de investigación.

2.- Se me ha informado que el procedimiento de obtención de células progenitoras hematopoyéticas y el estudio citogenético no tendrá costo adicional para mí, o para mi familiar (paciente).

3.- Se me ha informado que las muestras donadas se usarán para realizar investigación, específicamente se determinará el número y el tipo de anomalías cromosómicas en las células progenitoras hematopoyéticas y en los linfocitos T. La investigadora responsable del proyecto es la Biol. Ma. Sotera Chávez Jacal, quien se hará cargo de mantener la confidencialidad de las muestras y de la información del cuestionario; la Biol. Chávez también se responsabilizará de que estas muestras se utilicen exclusivamente para el desarrollo de este proyecto.

4.- Entiendo que este estudio puede no tener beneficios directos para mí, pero si para mi familiar (paciente), y puede contribuir al conocimiento de los efectos que tiene la exposición de los medicamentos usados para el tratamiento del cáncer.

5.- Se me ha informado que se me entregará una copia de esta carta de consentimiento, y que si tengo alguna duda será aclarada por la responsable del proyecto.

Firma del donador.....

Testigo (nombre y firma).....

Responsable de la investigación: Biol. Ma. Sotera Chávez Jacal.....

Anexo 2

CUESTIONARIO
Hoja 1



Instituto Nacional de Cancerología

Depto. de Banco de Sangre

Nº Reg.	_____
Fecha	_____
Nº UNIDAD:	_____

A) IDENTIFICACION:

Nombre: _____ Sexo: M F Edad _____ Edo. Civil _____

Domicilio: _____ Teléfono _____

CALLE NUMERO COLONIA C.P. _____

MUNICIPIO / DELEGACION ESTADO

Escolaridad: Prof. Medio Sup. Sec. Prim: Lee/escrbe Analfabeta

Ocupación _____ Ingreso Mensual Prom: 1-2 SM > 2-3 SM >3 SM

Tipo donación Fam.: Altruista Dirigida Autólogo Aféresis Tipo _____ Otra _____

Donaciones Previas Si No F.U.D. _____ Nº de Donaciones en el año _____

Sitio: _____ Reacciones Postdonación _____

Nombre del Paciente: _____ Parentesco _____

Institucion de Procedencia: _____ Firma: _____

ACEPTO DONAR VOLUNTARIAMENTE

B) INDICADORES GEOGRAFICOS

Originario de: _____ Residencia Actual _____

Residencia los Ultimos 5 Años _____

En los Ultimos 5 Años Residente o Procedente de Zona Endémicas de:

Paludismo Chagas Brucelosis DONDE _____

Viaje Reciente a Zonas Endémicas de:

Paludismo Chagas Brucelosis Dengue Cuando: _____

C) ANTECEDENTES:

1.- Contacto con Enfermos de: Hepatitis Quién: _____

2.- Alguna vez le han Realizado Detección de VIH o AgaHb?

A Usted: SI NO Cuándo _____ A su Pareja: SI NO Cuándo _____

3.- Antecedentes Personales:

Alcoholismo Cantidad _____ Bebida Habitual _____ Toxicomanias Tipo _____

Tx. Dental Reciente Tipo _____ Etretnato Cirugia Menor Reciente

Tipo _____ Cirugia Mayor Reciente Tipo _____

Alergias Tipo _____ Inmunizaciones Tipo _____

4.- Antecedentes Patológicos:

Cardiopatías	<input type="radio"/> DX. _____	Brucelosis	<input type="radio"/>
Enf. Renales	<input type="radio"/> DX. _____	Diabetes Mellitus	<input type="radio"/>
Coagulopatías	<input type="radio"/> DX. _____	Hipertensión Arterial	<input type="radio"/>
Cáncer	<input type="radio"/> DX. _____	Tuberculosis	<input type="radio"/>
Neoplasia Hematologica	<input type="radio"/> DX. _____	Epilepsia / Sx Convulsivo	<input type="radio"/>
Anemia	<input type="radio"/> DX. _____	Lipotimias frecuentes	<input type="radio"/>
Infecciones Bacterianas	<input type="radio"/> DX. _____	Hepatitis	<input type="radio"/>
Chagas	<input type="radio"/>	Ictericia / Acolia / Coluria	<input type="radio"/>
Lepra	<input type="radio"/>	Transtornos mentales / Sx demencial	<input type="radio"/>
Paludismo	<input type="radio"/> Tiempo _____	Toxoplasmosis	<input type="radio"/>
Otras	<input type="radio"/> DX. _____	Transplante	<input type="radio"/>

Hoja 2

C) ANTECEDENTES:

5.- Antecedentes Gineco-Obstétricos:

FUR: _____ Gesta _____ Para: _____ Cesárea _____ Abortos _____

FUP: _____ FUG: _____ FUA: _____ Inducido

Espontáneo Isoinmunización M-F

Aplicación Globulina anti-D

D) PRACTICAS DE RIESGO

	DONADOR	CUANDO	PAREJA	CUANDO
1.- Transfusiones Previas	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
2.- Exdonador Remunerado	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
3.- Uso de Drogas I.V.	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
4.- Heterosexual Proms.	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
5.- Homosexual	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
6.- Bisexual	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
7.- Prostitución	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
8.- Contacto Sexual con Hemofílicos / Hepatitis / Desconocido	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
9.- Internamiento en Inst. Penales Mentales.	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
10.- Acupuntura, Tatuajes o Perforaciones.	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
11.- Lesiones con Objetos Hemocontaminados.	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____
12.- Enf. Transmisión Sex.	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____	SI NO _____

Tipo: _____

E) EN LOS ULTIMOS 6 MESES

- 1.- Tos/Disnea Persistente
- 2.- Perdida de Peso > 10 %
- 3.- Diarrea Crónica
- 4.- Diaforesis Profusa
- 5.- Astenia / Adinamia
- 6.- Adenomegalias
- 7.- Herpes Mucocutáneo
- 8.- Fiebre Continua > 10 d.
- 9.- Odinofagia > 30 d.

F) EN EL ULTIMO MES

- 1.- Sx Diarreico
- 2.- Isotretinoína/Tetraciclina

G) EN LA ULTIMA SEMANA

- 1.- Toma de medicamentos
- 2.- Cúal(es) _____
- 3.- Tiempo: _____ Dosis _____

H) EN LAS ULTIMAS 48 HRS.

Fiebre/Escalofrío

Ayuno Vigilia Hrs. _____

Ingesta de Alcohol Cont. _____

Beb. _____

I) EXPLORACION FISICA:

Peso: _____ Talla _____ FC _____ TA _____ TEMP. _____ Edo. Mental _____ Ictericia

Piel y Mucosas _____ Adenomegalias Area Cardiaca _____ Cs Ps _____

Hepatomegolia Esplenomegolia Otros: _____

Estado de Venas: Adecuado Dificil Valorado por: _____

J) DIAGNOSTICO

APTO NO APTO DIFERIDO CAUSA _____

K) OBSERVACIONES:

NOTA: ESTA HISTORIA CLINICA, DEBERA CONSERVARSE DURANTE 5 AÑOS EN EL BANCO DE SANGRE, BAJO ESTRUCTA CONFIDENCIALIDAD Y ESTARA A LA DISPOSICION DE LA S.S.A. CUANDO ASI LO SOLICITE.

NOMBRE Y FIRMA DEL MEDICO

12. Referencias

Abbas AK, Litchman AH, and Pober JS. Cytokines. In: *Inmunología Celular y Molecular*. 1ª. Reimpresión. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. Madrid. 2000.

Acquintella G. *Manual de quimioterapia*. 3ª edición. Caracas, Venezuela. 1995.

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

Anderlini P, Donato M, Chan KW, Huh YO, Gee AP, Lauppe MJ, Champlin RE, and Körbling M. Allogenic blood progenitor cell collection in normal donors after mobilization with filgrastim: The M. D Anderson Cancer Center experience. *Transfusion* 39: 555- 560. 1999.

Anderson HC. The spontaneous frequency of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in cultures peripheral lymphocytes of a single blood donor sampled more than 200 times. *Mutation Research* 286: 281- 292. 1993.

Avalos BR, Gasson JC, and Hedrat C. Human granulocyte colony stimulating factor: Biologic activities and receptor characterization cells and small cells lung cancer cell lines. *Blood* 75(4):851-857. 1990,

Becker PS, Wagle M, Matous S, Swanson RS, Pihan G, Lowry PA, Stewart FM, and Heart SO. Spontaneous splenic rupture following administration of Granulocyte Colony- Stimulating Factor (G-CSF) occurrence in a allogenic donor of peripheral blood stem cell. *Biol Blood Marrow Transplant* 3(1): 45- 49. 1997.

Besinger WI, Clift R, Martin P, Appelbaum FR, Demirer T, Gooley T, Lilleby K, Rowley S, Sanders J, Storb R, and Buckner CD. Allogenic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: A retrospective comparison with marrow transplantation. *Blood* 88(7):2794-2800. 1996.

Budel LM, Touw IP, Delwel R, and Lowenberg B. Granulocyte colony-stimulating factor receptors in human acute myelocytic leukemia. *Blood* 74(8): 2668- 2673. 1989.

Burt KR, Deeg JH, Lothian TS, and Santos WG. *On Call In Bone Marrow Transplantation*. U.S. and Canada Copyright. R.G Landes Company and Chapman & Hall. USA. 1996.

Carbonell E, Peris F, Xamena N, Creus A, and Marcos R. Chromosomal aberration analysis in 85 control individuals. *Mutation Research* 370: 29- 37. 1996.

Cebon J, Layton JE, Maher D, and Morstyn G. Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *Br J Haematol* 86:265-274. 1994.

Chao NJ, and Blume KJ. Reconstitution of hematopoiesis following allogenic bone marrow transplantation. In: *High-Dose cancer Therapy-Pharmacology, Hematopoietins, Stem cells*. Armitage JK, Antman KH (eds). William & Wilkins, Baltimore. 1992.

Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapuis B, Chopra R, Cornelissen JJ, Gale RP, Goldman JM, Loberiza FR, Hertenstein B, Klein JP, Montserrat E, Zhand MJ, Ringdén O, Tomany SC, Rowlings PA, Van Hoef M, and Gratwohl A. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogenic transplantation. *Blood* 95(12): 3702- 3709. 2000.

Craddock CH. Haemopoietic stem-cell transplantation: recent progress and future promise. *The lancet* 1:227-234. 2000.

De Fabritiis P, Lori AP, Mengarelli A, Gozzer M, Ferraza G, De Proris MS, Romano A, and Arcese W. CD34+ cell mobilization for allogenic progenitor cell transplantation: efficacy of a short course of G-CSF. *Transfusion* 41:190-195. 2001.

De la Rubia J, Díaz MA, Verdager A, Pascual MJ, Arbona C, Arrieta R, Brunet S, Bargay J, Martínez C, Espigado I, Serrano D, Alegre A, De Arriba F, De la Serna J, Zamora C, Benlloch L, and Zanz MA. Donor age-related differences in PBPC mobilization with rHuG-CSF. *Transfusion* 41:201-205. 2001.

Dexter TM, Allen TD, and Lajtha LG. Conditions controlling the potentiation of haemopoietic stem cells in vitro. *J cell physiol* 91:335-344. 1977.

Fibbe WE, Van Damme J, and Billiau A. Interleukin-1 induces human marrow stromal cells in long-term culture to produce granulocyte-colony stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 71(2):430-435. 1988.

Gabrilove JL, and Jakubowski A. Granulocyte colony-stimulating factor: preclinical and clinical studies. *Hematology/ Oncology clinics of North America* 3(3):427-440. 1989.

Ganser A, and Karthaus M. Clinical use of hematopoietic growth factors. *Current Opinion in Oncology* 8: 265-269. 1996.

Gardner RJ, and Sutherland GR. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. Oxford University Press, Inc. New York, NY. 1989.

Guízar-Vázquez JJ. *Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*. Manual moderno. México, D.F. 2001.

Goldman J. Peripheral Blood Stem Cells for Allografting. *Blood* 85(15): 1413-1415. 1995.

Grigg A, Lush J, and Szar J. G-CSF stimulated donor granulocyte collections for neutropenic sepsis. *Leukemia- Lymphoma* 18(3-4): 329- 334. 1995a.

Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton JE, Boyd AW, McGrath KM, and Maher D. Optimized dose and scheduling of filgrastim (Granulocyte Colony- Stimulating Factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 86(12): 4437- 4445. 1995b.

Groopman JE, Molina J-M, and Scaden DT. Hematopoietic growth factors: Biology and clinical applications. *New England Journal of medicine* 321:1449-1459. 1989.

Hernández JM, Castilla C, Gutiérrez NC, Isidro IM, Delgado M, De las Rivas J, Fermián E, García JL, Ocio EM, Del Cañizo MC, y San Miguel JF. Mobilization with G-CSF in healthy donors promotes a high but temporal deregulation of genes. *Leukemia* 19:1088-1091. 2005.

Hester JP, Dignani MC, Anaissie EJ, Kantarjian HM, O'Brien S, and Freireich EJ. Collection y transfusion of granulocyte concentrates from donors primed with Granulocyte Stimulating Factor and response of myelosuppressed patients with established infection. *J Clin Apheresis* 10(4): 188- 193. 1995.

Hidalgo A, Peired AJ, Weiss LA, Katayama Y., and Frenette PS. The integrin $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ anchors hematopoietic progenitors in the bone marrow during enforced mobilization. *Blood* 104(4): 993-1002. 2004.

Joshi SS, Lynch JC, Pavletic SZ, Tarantolo SR, Pirruccello SJ, and Kessinger A. Decreased immune functions of blood cells following mobilization with granulocyte colony- stimulating factor: association with donor characteristics. *Blood* 98(6): 1963- 1970. 2001.

Kaplinsky C, Trakhtenbrot L, Hardan I, Reichart M, Daniely M, Toren A, Amariglio N, Rechavi G, Izraeli S. Tetraploid myeloid cells in donors of peripheral blood stem cells treated with rhG-CSF. *Bone Marrow Transplant.* 32(1):31-34. 2003.

Kasura V, Sentija K, Garaj- Vrhovac V, and Fucic A. Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from control individuals. *Mutation Research* 346: 187- 193. 1995.

Lane TA, Law P, Maruyama M, Youny D, Burgess J, Mullen M, Mealiffe M, Terstappen L, Hardwich A, Moubayed M, Oldham F, Corringham R, and Ho AD. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) or G-CSF: Potential role in allogenic marrow transplantation. *Blood* 85(1): 275-282. 1995.

Lieschke GJ, and Burgees AW. Drug therapy : Granulocyte Colony Stimulating Factor and Granulocyte- Macrophage Colony- Stimulating Factor (second of two parts). *New England Journal of Medicine* 327(2): 99- 106. 1992.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, and Darnell J. *Molecular cell biology*. 4th ed,: W. H. Preeman and Company. New York 2000.

Lord BI, Bronchud MH, and Owens S. The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 86(23):9499-9503. 1989.

Martínez C, Urbano- Ispizua A, Rozman M, Rovira M, Marín P, Montfort N, Carreras E, and Montserrat E. Effects of short- term administration of G-CSF (filgrastim) on bone marrow progenitor cells: analysis of serial marrow samples from normal donors. *Bone Marrow Transplantation* 23: 15-19. 1999.

Martínez C, Urbano-Izpisua A, Rozman C, Marín P, Mazzara R, Carreras E, Rovira M, Sierra J, Briones J, and Montserrat E. Effects of G-CSF administration and peripheral blood progenitor cell collection in 20 healthy donors. *Ann Hematol* 72(4): 269- 272. 1996.

Mayani H, Alvarado-Moreno JA, and Flores-Guzmán P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation: A review. *Archives of Medical Research* 34:476-488. 2003.

Metcalf D. The basic biology of haemopoiesis. In: *The molecular control of lots cells*. Harvard University Press, London. 1988.

Migliaccio AR, Migliaccio G, and Johnson G. Comparative analysis of hematopoietic growth factors released by stromal cells from normal donors or transplanted patients. *Blood* 75(1):305-312. 1990.

Miller OJ, and Therman E. *Human Chromosomes*. Springer-Verlag. New York, NY. 2001.

Minegishi N, Suzuki N, Yokomizo T, Pan X, Fujimoto T, Takahashi S, Hara T, Miyajima A, Nishikawa S, and Yamamoto M. Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood* 102(3):896-915.

Molineux G, Pojda Z, Hampson IN, Lord BI, and Dexter TM. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony- stimulating factor. *Blood* 76(10):2153- 2158. 1990.

Morstyn G, and Burgess AW. Hemopoietic growth factors: A review. *Cancer Res* 48:5624-5637. 1988.

Nagler A, Shur I, Barak V, and Fabian I. Granulocyte- Macrophage Colony Stimulating Factor dependt Monocyte- mediated Cytotoxicity Post- Autologous Bone Marrow Transplantation. *Leukemia Research* 20: 637- 643. 1996.

Navarrete MJ, Zavala C, Lisker R, y Cobo A. Estudio longitudinal sobre la frecuencia de aberraciones estructurales cromosomicas en veinte sujetos normales. *Rev. Invest. Clin.* 27:275-280.1975.

Nicola NA. Why do hemopoietic growth factors receptors interact with each other? *Immunology today* 8:134-140. 1987.

Natarajan AT, Vyas RC, Darroudi F, Mullenders LH y Zdzienicka MZ. DNA lesions, DNA repair, and chromosomal Aberrations In: Obe G y Natajara AT. *Chromosomal Aberrations*. Springer-Verlag. New York, NY. 1990

Parkkali T, Volin L, Siren MK, and Ruutu T. Acute iritis induced by Granulocyte Colony Stimulating Factor used for movilization in a volunteer unrelated peripheral blod progenitor cell donor. *Bone Marrow Transplant* 17(8): 433- 434. 1996.

Petersdorf EW and Anasetti C. Unrelated-donor stem cell transplantation therapy. In: *Hematology. Basic principles and practice*. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, and Mc Glave P (eds). Elsevier Inc. USA 2005.

Possion A, Locatelli F, Prete A, Pigna A, Magrini E, Conte R, Rosito P, and Paolucci G. G-CSF in an infant donor: a method of reducing harvest volume in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 17: 431- 432. 1996.

Prosper F, Stroncek D, and Verfaillie CM. Phenotipic and funtional characterization of long-term culture initiating cells present in peripheral blood progenitor collections of normal donors treated with Granulocyte Colony-Simulating Factor. *Blood* 88(6): 2033- 2042. 1996.

Rakowicz-Szulczynska EM. Nuclear localization of growth factors and monoclonal antibodies. CRC Press. University of Nebraska Medical Center. Omaha, Nebraska. 1994.

Richman C, Weiner RS, and Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 47:1031-1034. 1976.

Rondelli D, Andrews GR, Hansen AJ, Ryncars R, Faerber AM, and Anasetti C. Alloantigen presenting function of normal human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* 88(7): 2619- 2625. 1996.

Rooney DE, and Czepulkowski BH. *Human cytogenetics*. John Wiiley & Sons. Oxford, UK.1994.

Rusell PJ. *Genetics*. Harper Collins Publishers. New York, NY. 1992.

Rutella S, Rumi C, Testa U, Sica S, Teofili L, Martucci R, Peschle C, and Leone G. Inhibition of lymphocyte blastogenic response in healthy donors treated with recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (rh-G-CSF): Possible role of lactoferrin and interleukin-1 receptor antagonist. *Bone Marrow Transplant* 20: 355. 1997.

Rutella S, Rumi C, Mothanje BL, Simona S, Cauda R, and Leone G. Serum of healthy donors receiving Granulocyte Colony-Stimulating Factor induces T cell unresponsiveness. *Exp Hematology* 26: 1024-1033. 1998.

Sack GH. *Génetica Médica*. Mc Graw-Hill. Interamericana. México. 2002.

Salamanca GF. *Citogenética Humana. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*. Edit. Médica Panameicana. México. 1990.

Sandberg AA. *Chromosome Instability Syndrome. The Chromosome in Human Cancer and Leukemia*. Second edition, Elsevier Science Publishing Co., Inc. N. Y. 1993.

Scott FG. *Development Biology*. Sixth edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Swarthmore College. pg 486. 2000.

Schmitz N, Bacigalupo A, Hasenclever D, Nagler A, Gluckman E, Clark P, Bourquelot P, Greinix H, Frickhofen N, Ringden O, Zander A, Apperley JF, Goring C, Borkett K, Schwab G, Goebel M, Rosell NH, and Gratwohl A. Allogeneic bone marrow transplantation vs filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with early leukemia: first results of a randomized multicentric trial of the European group for blood and marrow transplantation. *Bone marrow transplantation* 21:995-1003. 1998.

Steward WP. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *The Lancet* 342:153-156. 1993.

Suzuki, T., Muroi K., Amemiya Y., and Miura Y. Analysis of peripheral blood CD34+ cells mobilized with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) using a long-term culture system. *Bone Marrow Transplantation* 21: 751-757. 1998.

Talmadge JE, Reed EC, Kessinger A, Kuszynski CA, Perry GA, Gordy CL, Mills KC, Thomas ML, Pirruccello SJ, Lethaby BA, and Jackson JD. Immunologic attributes of cytokine mobilized peripheral blood stem cells and recovery following transplantation. *Bone Marrow Transplant* 17: 101. 1996.

Therman E. *Human Chromosomes. Structure, Behavior, Effects*. Second edition. Springer-Verlag New York. Inc. 1986.

Tjonnfjord GE, Steen R, Evensen SA, Thorsby E, and Egeland T. Characterization of CD34+ peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Blood* 84(8):2795-2801. 1994.

Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid DS, Eaves AC, and Eaves CJ. Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood* 80(10): 2513- 2521. 1992.

Van de Geijn GJ, Gits J, Aarts LH, Heijmans-Antonissen C, and Tour IP. G-CSF receptor truncations found in SCN/AML relieve SOCS3-controlled inhibition of STAT5 but leave suppression of STAT3 intact. *Blood* 104(3): 667-674. 2004.

Van Furt R. Hemopoietic Growth Factors and Mononuclear Phagocytes. Basal, Karger N.Y. 1993.

Van Oostveen IW, Bijil JJ, Raaphorst FM, Walboomers JJM, and Meijer CJLM. The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* 13: 1675-1690. 1999.

Vellenga E, Young DC, Wagner K, Wiper D, Ostapovics D, and Griffin JD. The effects of GM-CSF and G-CSF in promoting growth of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 69(8): 1771- 1776. 1987.

Volpi I, Peruccio K, Tosti A, Capani M, Ruggeri L, Posati S, Aversa F, Tabilio A, Romani L, Martelli MF, and Velardi A. Postgrafting administration of granulocyte colony-stimulating factor impairs functional immune recovery in recipients of human leukocyte antigen haplotype-mismatched hematopoietic transplants. *Blood* 97(8):2514-2521. 2001.

Watts MJ, Addison I, Long SG, Hartley S, Warrington S, Boyce M, and Linch DC. Crossover study of the haematological effects and pharmacokinetics of glycosylated and non- glycosylated G-CSF in healthy volunteers. *Br J Haematol* 98: 474- 479. 1997.

Weave CH, Longin K, Buckner CD, and Besinger W. Lymphocyte content in peripheral blood mononuclear cells collected after the administration of recombinant human Granulocyte Colony- Stimulating Factor. *Bone Marrow Transplant* 13(4): 411- 415. 1994.

Welte K, and Platzer KL. Growth Factors. Differentiation Factors and Cytokines. Granulocyte Colony- Stimulating Factor EA. Habenicht (ed). Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 1990.