

35
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO DE SINDROMES MIELODISPLASICOS Y
LEUCEMIAS AGUDAS NO LINFOCITICAS, CON
ALTERACION DE CELULAS PROGENITORAS
GRANULOCITO-MACROFAGOS; UTILIZANDO
MEDIOS DE CULTIVO COMO TECNICA DE
DIAGNOSTICO Y PRONOSTICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
LOPEZ ROLDAN LUZ MARIA
MARTINEZ MENDOZA MARIA ELENA

ASESOR: O.F.B. IDALIA AVILA MIYASAWA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDQ. DE MEX.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

270101



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.



LIBERTAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudio de Síndromes Mielodisplásicos y Leucemias Agudas no Linfocíticas, con Alteración de Células Progenitoras Granulocito-Macrófagos; Utilizando Medios de Cultivo como Técnica de Diagnóstico y Pronóstico.

que presenta la pasante: López Roldán Luz María
con número de cuenta: 7323185-7 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 23 de Octubre de 1998

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ramón Cendejas Ramírez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa</u>	
SECRETARIO	<u>Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Martha Patricia Campos Peón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. René Damián Santos</u>	

Agradecemos a :

A nuestra directora de tesis Idalia Avila Miyasawa, por su asesoría, respaldo, y su constante disponibilidad para la realización de este trabajo.

Nuestro más profundo agradecimiento al Dr. Héctor Mayani por los conocimientos compartidos.

A nuestros maestros por su enseñanza y guía durante nuestra formación.

Gracias a todo lo que representa nuestra Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a los que hicieron posible la realización de este trabajo.

Gracia a México por todos los momentos que hemos vivido en él.

A todos nuestro más profundo agradecimiento

María Elena y Luz María

A Dios

Por tener mucho que agradecer y poco que pedir.

A mis padres

Leopoldo y Guillermina por todos sus sacrificios que han hecho para poder culminar esto que empecé.

A mis hermanos

María, Dolores, Carlos y Jesús gracias por su apoyo, y por preguntarme ¿cuando vas a terminar? ya que sin ustedes no hubiera sido posible realizar esta meta.

A mi hermano Elías q.e.d. por todo lo vivido y lo que nos falta por compartir.

A mis sobrinos

Julio, Yazmin, Miguel, Luis (mi chiquito), Diána y Abigail.

A la Familia López Roldán.

Por adoptarme.

A mis amigos

Luz María por ser un ejemplo a seguir y aguantarme todo este tiempo.

A Rocío, Crucita, Eliza, Inocencia, Marisa, Irene, Claudia, Luz María, Gerardo, Petardo, Juan, Marco Antonio, Antonio, Arzel, Marroquín, Zelada, Pepe, Leonardo, Gabriel, Gerardo Peregrina, Beto y a todos los que me faltaron gracias por todos los momentos agradables..

A Gerardo por tu cariño y amistad.

A todos mis familiares y amigos que me han brindado su cariño a: Bety, Juana y Esther.

María Elena

Quiero expresar mi agradecimiento a Dios, quien cada día sin importar el momento y el lugar me ha dado su luz, que se manifiesta en amor y alegría.

Agradezco a Dios por haberme dado unos padres maravillosos Antonio y Paz, a quienes les doy las gracias por su gran amor, comprensión y libertad que me han brindado, para realizar en mi vida cada uno de los momentos que he vivido.

A mis hermanos Rosa María, Marco Antonio, Ana María y Verónica quienes cada día me han brindado su amor, sus consejos, sus conocimientos y estímulos.

A María Elena quien con paciencia y amor ha compartido muchos momentos de mi vida, y a toda su familia por brindarme su amistad.

A mis sobrinos Delmar, Gamaliel, Manuel y Ana Laura quienes con sus besos, caricia, juegos y ocurrencias me han dado una esperanza de luz para toda la humanidad.

A mis amigos de la escuela por su cariño y amistad a Inocencia, Gerardo Peregrina, Heriberto, Pepe Baxin, José, Leonardo, Gabriel, María Elena, Vicente, José Alfredo, Adriana.

Gracias al Dr. Guillermo Martínez López por su apoyo incondicional y su confianza que me han permitido terminar un ciclo importante de mi vida.

A mis compañeros del Hospital de Oncología quienes me han brindado su amistad, el interés y preocupación para que todo me vaya de maravilla.

A Joaquín, con todo respeto, quien motivo a continuar lo que hacía tiempo había empezado.

Al M. en C. Alejandro Marché Cova por su amistad, tiempo e iniciación en el desarrollo de este trabajo.

A todos mis familiares y amigos que me han brindado su cariño; a Martha, Jesús, Vicente y David.

"La iluminación es el conocimiento de uno mismo".

RESUMEN

El presente trabajo de tesis se realizó con la finalidad de conocer los sistemas de cultivo *in vitro* para médula ósea y sangre periférica desarrollados en las últimas dos décadas; éstos han permitido tener un gran avance en el conocimiento de la hematopoyesis humana, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. También, se revisaron las aplicaciones que tienen como técnicas de diagnóstico diferencial, pronóstico y tratamiento en la Leucemia Mielomonocítica Crónica y en las Leucemias Agudas Mieloblásticas.

Para tal fin, se conformó un trabajo desde los conceptos básicos e indispensables en el estudio de la hematología, lo cual permite interpretar lo que se pretende investigar a través de los medios de cultivo de sangre periférica y médula ósea *in vitro*.

La primera parte comprende la *Hematopoyesis*: función (Stem Cell), sitios donde se lleva a cabo, y regulación, así como, las características morfológicas de la línea mielopoyética que es posible identificar por microscopía óptica.

Un aspecto importante que se ha revisado y actualizado es el concepto de Microambiente Hematopoyético y la participación de las citocinas e interleucinas durante el proceso de la hematopoyesis tanto *in vitro* como *in vivo*.

Es importante puntualizar, que muchas de las funciones de estas citocinas en la hematopoyesis se han realizado en sistemas de cultivo *in vitro* y que en muchos casos se ha confirmado que sucede *in vivo*; de ahí la importancia de estudiar cada uno de los temas y en especial los sistemas de cultivo de células progenitoras de sangre periférica o médula ósea *in vitro* como técnica especial.

Para el estudio de las mielopatías es indispensable realizar una biopsia y/o aspirado medular, y en un futuro no muy lejano se sumarán los sistemas de cultivo *in vitro* de médula ósea y sangre periférica, así como los estudios que ofrece la biología molecular.

Una vez revisada la hematopoyesis en su conjunto, se continúa con la revisión de dos grupos de panmielopatías clonales: una son los Síndromes Mielodisplásicos y la otra las Leucemias Agudas Mieloides; y a título de introducción abordamos los aspectos generales de cada una de ellas y sus subtipos basados en la clasificación FAB.

Se describe con más detalle sobre la Leucemia Mielomonocítica Crónica (subtipo de Síndrome Mielodisplásico), y los subtipos M4 y M5 (de la Leucemia Mieloide Aguda).

Ahora bien, puesto que nuestro objetivo principal consiste en adentrarnos en los sistemas de cultivo *in vitro* para medula ósea y sangre periférica estudiamos las generalidades acerca de los sistemas de cultivo semisólido y líquido y pasamos a investigar sobre los trabajos que se tienen en relación a los patrones de

crecimiento que se han observado en las LMMC y en las LMA (M4 y M5), lo cual nos auxilia a llegar a un diagnóstico diferencial, conocer la evolución y el pronóstico de vida que tendría un paciente.

Se revisó el método de cultivo de Pike y Robinson, que resulta ser un sistema específico en el desarrollo de cultivos celulares de la línea granulo-monocítica.

Una de las terapéuticas empleadas hasta hoy en el tratamiento de Leucemias Agudas y Síndromes Mielodisplásicos, ha sido el Trasplante de Médula Osea (TMO), del cual hablamos en nuestro trabajo. Investigamos los aspectos técnicos y las complicaciones más frecuentes que se pueden tener durante la práctica de esta terapia.

En la actualidad, la utilización de células progenitoras a partir de sangre periférica, médula ósea y sangre de cordón umbilical en lugar del Trasplante de Médula Osea alogénico está aumentando, por lo cual, se considera que existe un gran interés en el desarrollo de nuevos métodos de estudio y de tratamiento que prometan mejores expectativas en el futuro y quizá los sistemas de cultivo in vitro sean una herramienta indispensable en el estudio y tratamiento de neoplasias hematopoyéticas.

ABREVIATURAS

Ac Mo	Anticuerpo monoclonal
AcHe	Acetil colinesterasa
AIMDM	Medio de Dulbecco modificado por Iscove para cultivos de agar.
BFU-E	Unidades Formadoras de Burtis Eritroides
CEN	Células no eritroides
CFU	Unidad Formadora de Colonias
CFU-C	" " " de Cultivo
CFU_GEMM	" " " de Granulocitos, Eritrocitos, Monocitos y megacariocitos
CFU-L	" " " Leucémicas
CFU-Mix	" " " Mixta
CFU-S	" " " de Bazo
CID	Coagulación intravascular diseminada
CIFU	Unidad de Formadora de Colonias Intermedias
CGp	Célula Germinal pluripotencial
CMF	Citometría de flujo
CMH	Célula Madre Hematopoyética
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CSA	Actividad Estimulante de Colonias
CSF	Factor Estimulante de Colonias
EA	Eritrocito unido a anticuerpo
EAC	Eritrocito unido a anticuerpo más complemento
EGF	Factor de crecimiento endotelial
EICH	Enfermedad de Injerto Contra el Huésped
Eo	Eosinófilo
EPO	Eritropoyetina
ERM	Enfermedad Residual Mínima
F	Fibroblastos
FAB	Organización Franco-Americo-Británico
FCS	Suero Fete
FISH	Hibridación in situ por Fluorescencia.
G	Granulocitos
GAG	Glucosaaminglicanos
GM	Granulomonocitos
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HNP	Hemoglobinuria nocturna paroxística
ICH	Intercambio de Cromátides Hermanas
IL(s)	Interleucinas
IMDM	Medio de Dulbecco Modificado por Iscove

LA	Leucemia Aguda
LANL	Leucemia Aguda no linfocítica
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LIA	Actividad Inhibitoria Leucémico
LIF	Factor Inhibidor de Leucemias
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crónica.
M	Monocitos
MIC	Clasificación Morfológica, Inmunológica, y Citogenética
MKB	Promegacarioblastos
MO	Médula Osea
MPO	Mieloperoxidasa
NK	Natural Killer
PAS	Acido Periodico de Shiff
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PF	Factor Plaquetario
PGE	Prostaglandina E
PGE	Prostaciclina
PGI	Prostaciclina
PHA	Fitoheماغlutinina
RC	Remisión Completa
SMD	Síndromes Mielodisplásicos
<u>SMF</u>	Sistema Mononuclear Fagocítico
SP	Sangre Periférica
SPL	Síndrome Preleucémico
TCN	Todas las Células Nucleadas
TGF	Factor de Crecimiento en Transformación
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TMO	Trasplante de Médula Osea
TSF	Factor estimulante de Trombopoyesis
UFC	Unidad Formadora de Colonias

ÍNDICE

Objetivos	1
Introducción	3
1.- HEMATOPOYESIS....	9
1.1 Organos hematopoyéticos	10
1.1.1 Sistema reticulo endotelial.	10
1.1.1.1 Funciones del sistema reticulo endotelial	13
1.1.2 Sistema mononuclear fagocítico	15
1.1.3 El bazo	17
1.1.4 El hígado	20
1.1.5 La médula ósea	21
1.1.6 Tejido linfático	25
1.1.6.1 Ganglio linfático	26
1.1.6.2 El timo	28
1.2 Microambiente y estroma medular	29
1.2.1 Importancia de la matrix extracelular	34
2. CELULAS MADRES (STEM CELL) Y PROGENITORES	
HEMATOPOYETICOS	39
2.1 Compartimento de células madre o división	39
2.1.1 Antígenos de superficie de las células madre	51

2.2	Compartimento de diferenciación y maduración	55
2.2.1	Precursores eritroides	56
2.2.2	Precursores granulocíticos	58
2.2.3	Precursores eosinófilos	60
2.2.4	Precursores basófilos	61
2.2.5	Precursores monocíticos	62
2.2.6	Megacariocitos o precursores plaquetarios	63
3.-	REGULADORES DE LA PRODUCCIÓN HEMATOPOYÉTICA	66
3.1	Factores estimulantes de colonias (CSFs) e interleucinas (Ils)	66
3.1.1	Receptores	74
3.1.2	Factores de crecimiento que actúan sobre una línea específica	79
3.1.3	Factores multilínea	85
3.1.4	Factores Sinérgicos	89
3.1.5	Factores que actúan indirectamente	95
3.1.6	Factores inhibidores	97
4.	REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS	104
4.1	Regulación de la eritropoyesis	106
4.2	Regulación de la granulopoyesis	108
4.3	Regulación de la trombopoyesis	117

5.- EXPLORACIÓN CLÍNICA DE LA HEMATOPOYESIS	125
5.1 Aspirado medular	125
5.2 Biopsia medular	128
5.3 Cultivo in vitro de progenitores hematopoyéticos	131
6.- SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS	136
6.1 Generalidades	136
6.2 Frecuencia	138
6.3 Etiología	139
6.4 Patogenia	140
6.5 Clasificación Hematologica de los Síndromes Mielodisplásicos:	
Organización Franco Americo-Britanica (FAB).	144
7. SMD CON ALTERACIÓN DE LA LÍNEA	
GRANULOMONOCÍTICA (G/M) PRINCIPALMENTE	150
7.1 Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)	150
7.1.1 Cuadro clínico	151
7.1.2 Pruebas de laboratorio en el diagnóstico de	
Leucemia Mielomonocítica Crónica	153
7.1.2.1 Biometría Hemática	154
7.1.2.2 Médula Osea	155

7.1.2.3 Métodos Citoquímicos	157
7.1.2.4 Lisozima	159
7.1.2.5 Estudios Citogenéticos	160
7.1.3 Tratamiento	161
7.1.3.1 Terapia hormonal	162
7.1.3.2 Inductores de diferenciación celular	162
7.1.3.3 Citocinas hematopoyéticas	163
7.1.3.4 Quimioterapia	165
8.- LEUCEMIA AGUDA NO LINFOCÍTICA (LANL)	166
8.1 Definición y generalidades	166
8.2 Frecuencia	167
8.3 Etiología	168
8.4 Clasificación de las Leucemias Aguda Mieloides (LAM) de acuerdo a la clasificación de la Organización Franco-Américo-Británico (FAB)	171
8.5 Clasificación Morfológica Inmunológica y Citogenética (MIC)	177
8.6 Diagnóstico diferencial de las Leucemia Aguda Mieloide	180
9. LEUCEMIA NO LINFOCÍTICA AGUDA CON ALTERACION DE LA LINEA GRANULOMONOCITICA (G/M) PRINCIPALMENTE	183

9.1. Cuadro Clínico de Leucemia mielomonocítica (M4) y Monocítica (M5)	183
9.1.2 Pruebas de Laboratorio en el diagnóstico de M4 y M5	186
9.1.2.1 Métodos Citoquímicos	190
9.1.2.2 Inmunofenotipificación en el diagnóstico de Leucemia Aguda Mieloide	192
9.1.2.3 Hallazgos afines de laboratorio	195
9.1.2.4 Estudio citogenético	196
9.1.2.5 Biología Molecular en el diagnóstico de leucemias	199
9.2 Tratamiento	200
9.2.1 Quimioterapia	200
9.2.2 Uso terapéutico de los factores estimulantes de colonias hematopoyéticos	203
10. TÉCNICAS DE CULTIVO DE MÉDULA OSEA Y SANGRE PERIFÉRICA	204
10.1 Importancia de los medios de cultivo	204
10.1.1 Unidad Formadora de Colonias	206
10.2 Sistemas de cultivo para médula ósea o sangre periférica	208
10.2.1 Cultivos semisólidos	208

10.2.2 Cultivos líquidos	209
10.3 Acondicionamiento de los medios de cultivo para células progenitoras hematopoyéticas	212
10.3.1 Métodos físicos de separación de células mononucleares de médula ósea y/o sangre periférica para cultivo	213
10.3.2 Composición de los medios semisólidos	215
10.3.2.1 Etapas de preparación	218
10.3.3 Medios condicionados	220
10.3.4 Composición de los medios líquidos	222
10.3.4.1 Etapas de preparación	223
10.4 Medios de cultivo para células progenitoras de la línea granulo-monocítica (G/M)	225
10.5 Uso de los medios de cultivo in vitro en SMD y LANL con alteración en la línea celular Granulomonocítico (G/M)	229
10.6 Aplicación de los medios de cultivo de médula ósea o sangre periférica durante la terapia del Trasplante de Médula Osea	242
11. TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA (TMO)	246
11.1 Generalidades	246
11.2 Importancia del sistema de histocompatibilidad (HLA)	248

11.3 Tipos de trasplante	252
11.4 Requisitos para un TMO	254
11.5 Técnica del TMO	256
11.6 Complicaciones asociadas al Trasplante de Médula Osea	258
11.7 Aplicación de trasplante de médula ósea en LAM y SMD con afectación en la línea granulomonocítica	261
11.8 Mielopoyesis después del TMO	262
11.9 Factores de crecimiento hematopoyético en el TMO	265
11.10 Futuro del Trasplante	267
Comentarios	268
Bibliografía	270

**ESTUDIO DE SINDROMES MIELODISPLASICOS Y
LEUCEMIAS AGUDAS NO LINFOCITICAS, CON ALTERACION
DE CELULAS PROGENITORAS
GRANULOCITOS/MACROFAGOS UTILIZANDO MEDIOS DE
CULTIVO COMO TECNICA DE DIAGNOSTICO Y
PRONOSTICO.**

OBJETIVOS :

- **Hacer una revisión de la hematopoyesis mieloide, considerando sus sistemas de regulación.**
- **Investigar las características clínicas de Síndromes Mielodisplásicos (SMD) y Leucemias Agudas no Linfocíticas (LANL).**
- **Estudiar la Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC) y Leucemia Mielomonocítica Aguda (M4) y Leucemia Monocítica (M5) en las que su principal alteración es sobre la línea de progenitores granulo-monocítica.**

- **Conocer los tipos de sistemas de cultivo in vitro de células progenitoras de médula ósea o sangre periférica y sus aplicaciones en la práctica clínica.**
- **Aplicación de los medios de cultivo in vitro de médula ósea como técnica de diagnóstico y pronóstico en Síndromes Mielodisplásicos (Subtipo Leucemia Mielomonocítica Crònica) y Leucemia Aguda no Linfocítica (subtipos M4 y M5).**
- **Conocer los diferentes tipos de Trasplantes como medida terapéutica en las diferentes malignidades hematológicas.**

INTRODUCCIÓN

La hemopoyesis (palabra de raíces griegas hemo: sangre y poiesis: producción). Formación y producción de sangre, en especial de los elementos celulares ²³³ .

La hematopoyesis es uno de los sistemas indispensables en la vida humana y en la actualidad existen muchas incógnitas acerca del origen, producción y regulación de la hematopoyesis.

Diariamente se originan y mueren un número importante de células en cada uno de los sistemas celulares sanguíneos. Así mismo, al morir unas deben de producirse otras células, y esto es posible gracias a la existencia de una CÉLULA PLURIPOTENCIAL HEMATOPOYETICA; concepto aceptado desde hace mucho tiempo, siendo Till Mc Culloch quienes sustentaron las bases de este proceso²⁰¹ .

La célula tallo hematopoyética es conocida como célula madre hematopoyética (CMH) la cual tiene la potencialidad para diferenciarse hacia dos grandes vertientes citofuncionales: una célula madre mieloide (CMM) y una célula madre linfoide (CML) ^{24, 201} .

La característica funcional más importante de estas células es su capacidad de AUTOPERPETUACIÓN Y DIFERENCIACIÓN, ya que en presencia de un estímulo específico, y bajo la existencia de un microambiente hematopoyético óptimo (factores de amplio estudio) es posible que la CMH entre en mitosis, dando lugar a dos células hijas, de las cuales una de ellas se compromete con la DIFERENCIACIÓN

hacia una de las líneas celulares y la otra célula hija se AUTOPERPETUA^{24,201}.

Los fenómenos de división, diferenciación y maduración de los precursores hematopoyéticos se hallan finamente regulados por mecanismos homeostáticos complejos basados en sustancias o factores estimulantes o inhibidores específicos cuyo conocimiento está en constante evolución, todo se encuentra involucrado dentro del nicho celular y fibrilar llamado microambiente hematopoyético el cual lo integran numerosos elementos celulares^{24,230}. Entre ellos merece destacarse: Las células endoteliales y adventiciales de los sinusoides; monocitos y macrófagos medulares; fibroblastos, mastocitos y adipocitos; ciertas poblaciones linfoides, fundamentalmente linfocitos T; células con actividad "natural Killer" (NK) y, finalmente fibras colagénicas reticulares^{24,228,230}.

El proceso de diferenciación celular es desde un punto de vista muy simplificado un mecanismo represivo de la expresión genética realizado por el complemento genético de la célula²²⁸. Es probable que cuando dicha represión y diferenciación se lleve más allá de un punto determinado, la división celular sea imposible para la célula. Por ejemplo, no existen evidencias que sugieran que un polimorfonuclear maduro se reproduzca por mitosis²²⁸.

En los adultos, la CMH más primitiva es totipotencial pues da origen a todas las células sanguíneas, es al mismo tiempo pluripotencial para los sistemas linfóide y mieloide^{24,201,230}.

En el sistema de CMH linfóide dará origen ulteriormente a dos tipos inmunológicos principales T y B de linfocitos, y no B, y no T del sistema²²⁸.

Nuestro estudio se basará principalmente en el sistema hematopoyético mieloide y en particular sobre la línea granulomonocítica, estudiando su biología y las patologías que llevan a síndromes mielodisplásicos (SMD) principalmente leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) y leucemias agudas no linfoides (LANL) subtipo M4 (mielomonocítica) y M5 (monocítica), que involucra dicha línea celular. Los SMD y el síndrome preleucémico (SPL) son sinónimos para un grupo de trastornos clonales proliferativos de la médula ósea que se caracteriza por una dismielopoyesis y citopenias de la sangre periférica que evolucionan con frecuencia a una leucemia aguda^{20,94,229}.

La incidencia de los SMD supera en algunas estadísticas al número de Síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPc). Su diagnóstico, aunque puede realizarse en todas las edades de vida, en más del 90% de las ocasiones es en sujetos de más de 40 años^{24,94,229}.

La utilización de los medios de cultivo para el crecimiento in vitro de los precursores granulopoyéticos en los síndromes mielodisplásicos han permitido reconocer grupos de enfermos con un patrón de crecimiento característico y por tanto un pronóstico diferente.

En SMD los medios de cultivo son utilizados en estudios citodinámicos que muestran resultados muy variables según el caso.

En un 45% de los pacientes se encuentra un descenso de la capacidad clonogénica in vitro de progenitores granulo-monocíticos (CFU-GM). Por el contrario en el 50% de los casos aquella es normal y en un 5% derivan a una leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) 20,24,85,94,229

El conjunto de SMD evolucionan de manera diferente; constituyendo el 20% de estos los que terminan transformándose en una leucemia aguda no linfocítica.

Las Leucemias agudas no linfocíticas (LANL) constituyen un grupo heterogéneo de padecimientos caracterizados por la acumulación de precursores hematopoyéticos malignos^{94,161}.

En LANL se ha observado que los patrones de crecimiento en medios de cultivo tienen valor pronóstico predictivo particularmente, ya que presentan una población de células con morfología predominantemente primitiva y que fallaron en la adquisición de las propiedades de las células maduras. En LANL estas células predominantes son los blastos. De ahí, la importancia del uso de los medios de cultivo durante el estudio de los SMD (LMMC) y LANL (M4 y M5).

Es de nuestro interés conocer cuáles son los tipos de sistema de cultivo que existen y cuáles las condiciones básicas para poder llevar a cabo cultivos de médula ósea y sangre periférica, además nos introducimos al estudio de los patrones de crecimiento para las mielopatías antes señaladas y conocer cuál es la utilidad de éstos medios para entender la biología de la hematopoyesis in vitro normal y

patológica, y así mismo damos cuenta de la importancia que adquieren en la actualidad estos sistemas de cultivo como herramienta en el diagnóstico y pronóstico de las mielopatías hematopoyéticas.

Tanto en SMD y LANL no siempre pueden ser controladas mediante quimioterapia y radioterapia; por lo cual existe como alternativa el Transplante de Médula Ósea (TMO) ^{15,201}.

La médula ósea requerida para el transplante es obtenida por aspiraciones múltiples de los huesos pélvicos y ocasionalmente del esternón del donante bajo anestesia y en condiciones estériles. Las células medulares nucleadas son infundidas luego por vía intravenosa al receptor ^{15,24,132,229}.

Las células primitivas siembran la cavidad medular y se dividen en 2-4 semanas, la celularidad medular aumenta y se elevan los recuentos de la sangre periférica. Finalmente los sistemas inmune y hematopoyético completos del receptor, están compuestos de células del donante incluyendo las células plasmáticas y los macrófagos hísticos ^{24,230}.

El TMO debido a las características inmunológicas y genéticas de cada individuo para poderse llevar a cabo requiere que el donador y receptor tengan un HUMAN LYNFOCYTE SYSTEM A (HLA) lo más semejante posible ^{15,132,228}.

La identidad genotípica HLA se establece mediante el serotipado de HLA-A y B mediante la no reactividad mutua de los linfocitos del

donante y del receptor en un cultivo mixto de leucocitos, que indica una identidad para el HLA-D^{15,132,229}.

Existen diferentes tipos de trasplantes como son:

- a) Singénicos: son los que poseen material genéticamente idéntico.
- b) Alogénicos: los de material no genéticamente idéntico.
- c) Autogénicos: en los que el material se autotransfiere, por lo que es genéticamente idéntico.

Durante el transcurso de la investigación, se mencionan los principales aspectos inmunológicos que involucra un TMO alogénico y singénico^{15,132}.

La importancia de poder obtener el donador de médula ósea adecuado hace posible disminuir la reacción de rechazo denominada Enfermedad de Injerto Contra Huésped (EICH). Donde los linfocitos del donante reconoce como extraño y atacan a las células del receptor. De lo cual dependerá el éxito o fracaso del TMO^{15,132,183,228,230}.

En este trabajo se habla del trasplante de médula ósea, ya que, en algunos pacientes significa el último recurso terapéutico para tener un tiempo de supervivencia mayor; y al mismo tiempo damos cuenta de sus riesgos y que por lo cual es necesario seguir buscando nuevas alternativas de tratamiento con menores complicaciones y que quizá no sea muy lejano el tiempo en el que los medios de cultivo estudiados aquí representen una herramienta más en la terapéutica de las mielopatías.

CAPITULO 1

HEMATOPOYESIS

La hemopoyesis (es un conjunto de procesos que determinan la formación de todas las células sanguíneas).

Como se sabe la hematopoyesis en el adulto se realiza en la médula ósea roja localizada en los huesos planos del esqueleto axial (cráneo, costillas, esternón, vértebras y pelvis) y algunas epífisis de los huesos largos (fémures y humeros) cuya localización central a medida que alcanza la vida adulta, obedece a la denominada ley de Newman²²⁹. En el embrión la hematopoyesis ocurre primero en el saco vitelino, luego se lleva a cabo en el hígado y, también se realiza en forma transitoria en el bazo y los riñones⁹⁴. A lo largo de la vida en éstos últimos órganos persiste cierta capacidad hematopoyética capaz de expresarse en circunstancias patológicas en la denominada metaplasia mieloide hepatoesplénica²²⁹. La figura 1.1 representa gráficamente la importancia de cada uno de éstos órganos en la hematopoyesis a lo largo de la vida.

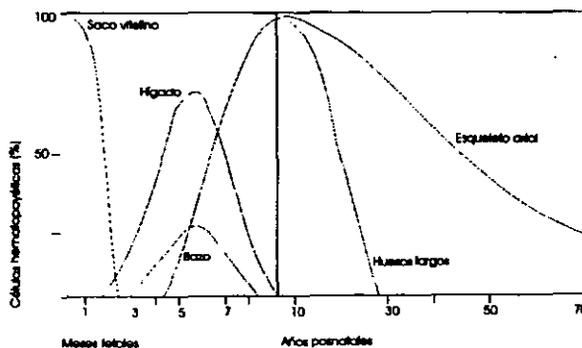


Fig. 1.1 Distribución anatómica de la hematopoyesis a lo largo de la vida(85).

Al hablar del sistema hematopoyético, en realidad es necesario estudiar un conjunto de sistemas indispensables para llevar a cabo la hematopoyesis. Se inicia describiendo los órganos hematopoyéticos que presentan características comunes debido a la presencia en todos ellos del Sistema Reticulo Endotelial³⁴.

1.1. ORGANOS HEMATOPOYETICOS

1.1.1. SISTEMA RETICULO ENDOTELIAL

Los órganos hematopoyéticos presentan una estructura hística de sostén y en medio se distribuyen las células en diferentes fases de maduración. Este sistema celular que actúa de trama es el tejido reticuloendotelial.

El tejido reticuloendotelial es un derivado del mesénquima embrionario, el cual está formado por la célula reticular la cual tiene características hísticas que le permiten formar entre si amplias redes.

Muy afín a este tejido por su origen, estructura y funciones es el tejido endotelial. El tejido endotelial sinusal está formado por células endoteliales parecidas a las reticulares. La conformación hística de las células forman cavidades sinusales que se comunican ampliamente entre si, formando un amplio espacio dentro de las cuales la sangre o linfa circula despacio o permanece estancada.

La armazón de estas dos células que presentan los órganos hematopoyéticos la gran cantidad que la conforman son las fibras de reticulina; las cuales forman una red que guarda íntima relación con las células reticulares, y por otra parte forman unas estructuras circulares, bastante uniformes, alrededor de los espacios sinusales.

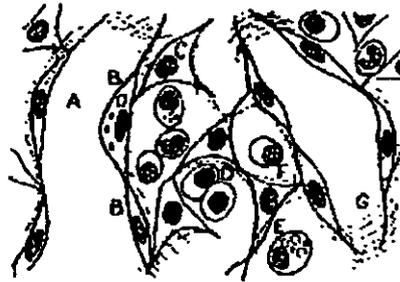


Fig.1.2 Esquema histológico del sistema reticuloendotelial (pulpa roja esplénica): A, espacios sinusales; B, células endoteliales; C, células reticulares; D, histiocitos; E, macrófagos histiocitarios; F, células plasmáticas; G, Fibras de reticulina (34).

El tejido reticular, los endotelios sinusales y la formación común de fibras de reticulina, constituyen el tejido de sostén de los órganos hematopoyéticos (término puramente histiológico). El tejido reticuloendotelial forma dos tipos de cavidades las más estrechas son las que dejan las células reticulares y las más amplias son los espacios sinusales (fig.1.2).

Dentro de estas cavidades están las células ya libres, que al ir madurando pasarán a los espacios sinusales, desde donde serán vertidas, ya maduras, a la circulación general (fig.1.3)³⁴.



Fig. 1.3. Estructura de la médula ósea roja y salida de una célula madura de ésta (20).

El concepto de sistema reticuloendotelial es puramente fisiológico y fue creado por Aschoff quien observó que ciertos colorantes eran absorbidos por algunas células del organismo, e incorporadas a su protoplasma. Así las células del tejido reticuloendotelial coinciden en un mismo grupo tanto históricamente como fisiológicamente formando una estructura fija³⁴.

Las estructuras libres, que se encuentran entre las cavidades descritas fueron analizadas por Kiyomo, observando que eran quienes absorbían el colorante por lo que tienen actividad macrofágica, y las denominó histiocitos. Este histiocito, es en realidad una célula del retículo endotelio

que se ha liberado. Son células grandes con protoplasma abundante conteniendo partículas fagocitadas, núcleo oval de cromatina laxa, con uno o dos nucléolos. Existen otras células con actividad fagocítica como los monocitos y que se integran al Sistema Retículo Endotelial (S.R.E.)³⁴.

Existen otras células también incluidas al sistema como son las células plasmáticas o cianófilas de Cajal, derivadas del tejido reticuloendotelial, poseen una acción defensiva (no fagocítica) contra agentes inflamatorios.

En resumen las células que se incluyen al S.R.E. son:

- 1) Las células del tejido reticular y del endotelio sinusal.
- 2) El histiocito de los tejidos y el monocito sanguíneo.
- 3) La célula plasmática (en parte)³⁴.

1.1.1.1. Funciones del sistema retículo endotelial

El S.R.E. forma un verdadero órgano, extendido por todo el cuerpo humano, y posee una serie de funciones que son las siguientes:

1) Acción mecánica o de sostén

Conformada por sus células y fibras de reticulina; una buena preparación argéntica en hígado o bazo permite ver la importancia de este sistema de sostén.

2) Acción Péxica y Fagocitante

Goldman (1912) observó que las substancias que eran retenidas por el S.R.E. eran de naturaleza ácida (azul pirrólico, azul de tripano etc.) y en tanto las básicas no se absorben.

Además se observó que la carga eléctrica es importante para retener sustancias, así las de carga electronegativa son las que pueden absorber. Otras sustancias electronegativas como la plata coloidal, tinta china, carbón, bacterias, colesterol, lecitina etc., son captados por el retículo endotelio. Así mismo, muchas sustancias coloides pueden ser captados por el retículo endotelio³⁴.

De esta manera el poder Péxico del S.R.E. retira de los humores a bacterias, protozoos, hongos, la sílice coloidal de los pneumoconióticos, y proteínas del mieloma, etc. Constituyendo así un campo de defensa; para la cual intervienen las vesículas del retículo endoplásmico y los lisosomas o corpúsculos líticos, los cuales liberan ciertas enzimas que desintegran los restos fagocitados.

Los macrófagos por su acción de captación de antígenos y presentación a los linfocitos desencadenan al sistema inmune con la correspondiente formación de anticuerpos.

3) Hemocatéresis

Los hematíes viejos al detenerse en los senos del bazo y otros sinusoides del S.R.E. son desintegrados y su hemoglobina convertida en una fracción carente de hierro (hematoidina), y otra con hierro (hemosiderina).

4) Otras funciones:

- a) Ferropéxica: El S.R.E. capta el hierro liberado de la hemoglobina, y lo almacena.

b) Lipopéxia: Los histiocitos captan colesterol.

c) Proteínas: Las células plasmáticas producen fracciones globulínicas de las proteínas plasmáticas.

5) Funciones inmunitarias

El S.R.E. interviene en la producción de sustancias inmunoagentes del tipo de anticuerpos: aglutininas, precipitinas, lisinas, complemento, opsoninas, bacteriotropinas, antitoxinas etc. Sustancias que participan en el sistema humoral de la inmunidad^{34,228,229}.

1.1.2. EL SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCITICO

Debido a que Aschoff integro al macrófago (en 1924) como miembro del sistema reticuloendotelial, que entre otras funciones metabólicas tenía una gran actividad fagocítica, decidió que el mejor nombre para el sistema que había descubierto era "reticuloendotelial", puesto que las dos células que figuraban predominantemente en muchos de los órganos que estudió y que compartían una capacidad específica de fagocitosis y otras propiedades, eran células reticulares y endoteliales. No obstante surgieron problemas para: 1) Identificar qué es exactamente una célula reticular; 2) En la actualidad se acepta que ni las células reticulares ni las células endoteliales son fagocíticas; 3) El S.R.E. original incluía un grupo muy heterogéneo de células mesenquimáticas de origen muy diferente como macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, sobre la base de la entonces aceptada (pero negada en la actualidad) libre interconvertibilidad de diversos tipos de elementos mesenquimáticos.

En un esfuerzo por rescatar el sistema retículo endotelial de los problemas recién enunciados, se propuso su sustitución por el término de **sistema mononuclear fagocítico (SMF)**. Término acuñado 1964, el cual tiene una única función distintiva (fagocitosis), un único origen histiogénico (la médula ósea) y un número limitado de diferentes miembros celulares periféricos (únicamente tres: monocitos, macrófagos libres y macrófagos fijos o tisulares)¹⁵⁰.

Las células del SMF tienen como principales misiones las de defender al huésped frente a la agresión de diversos agentes, principalmente de tipo infeccioso (gracias a sus propiedades de migración, fagocitosis y actividad microbicida), eliminar las células sanguíneas viejas o alteradas, presentar antígenos al sistema inmune y estimular el proceso inflamatorio mediante la síntesis de múltiples factores solubles como el interferón, las interleucinas, las prostaglandinas, el factor de necrosis tumoral y los factores de crecimiento de las células hematopoyéticas. El SMF se halla en numerosos órganos, principalmente en el bazo, hígado, ganglios linfáticos y pulmón. Los macrófagos fijos o histiocitos tisulares pueden ser esplénicos, hepáticos (células de Kupffer), alveolares, de los ganglios linfáticos, de la médula ósea (osteoclastos), macrófagos de las cavidades serosas (por ejemplo los peritoneales y pleurales), células de la microglía, macrófagos del tubo digestivo, de las glándulas mamarias y las de Langerhans de la piel.

Las células del SMF se caracterizan además de su morfología, por ser muy ricas en hidrolasas ácidas (fosfatasa ácida, β -glucuronidasa, α -naftilacetoesferasa ácida) y esterases inespecíficas, en adaptación a su intensa capacidad digestiva. También contienen muramidasa, proteasas

neutras, inhibidores enzimáticos como la α_2 -macroglobulina, factor quimiotáctico de los neutrófilos y ciertas proteínas como la fibronectina y transcobalina II. Presentan receptores de superficie para el C3 y la región Fc de las inmunoglobulinas e inmunológicamente se identifican mediante anticuerpos monoclonales específicos¹⁸⁰.

Sin embargo, esta nomenclatura podría excluir células endoteliales y fibroblastos lo cual podría producir confusión y caos. Por lo cual el concepto de SRE propuesto a principio del siglo XX aparentemente es valido y continua siendo utilizado en la práctica hoy en día¹⁴.

1.1.3. EL BAZO

El bazo está situado en la porción superior izquierda del abdomen, detrás del estomago y cerca del diafragma, pesa entre 150 a 180 g en la edad media y mide unos 7 cm de ancho por 12 de largo, dependiendo del tamaño de la repleción sanguínea y desarrollo del tejido linforreticular²²⁸.

El bazo se encuentra rodeado por una cápsula de colágeno y fibras musculares lisas que penetra en el parénquima del órgano. Estas trabéculas, junto con el entramado reticular, sirven de soporte a la gran variedad de células que se encuentran en el interior de este órgano³⁴.

Embriológicamente el bazo es un órgano formador de glóbulos sanguíneos, tanto blancos como rojos, cesando esta actividad eritropoyética a los 5 meses de vida intrauterina, encargándose de esta la médula ósea⁸⁵.

El bazo en condiciones normales produce linfocitos a partir de los folículos de Malpighi, por otra parte las células esplénicas del retículo endotelio esplénico producen: monocitos, células histiocitarias, macrófagos y ocasionalmente células gigantes. En patologías el tejido esplénico puede adquirir la capacidad hemocitopoyética perdida^{228,229}.

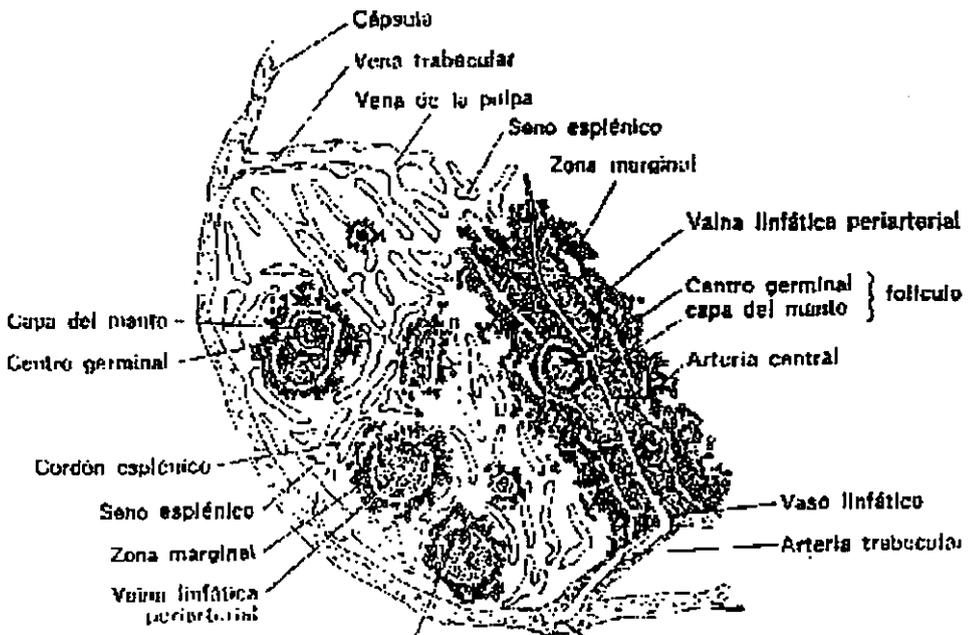


Fig. 1.4. La estructura del bazo: La pulpa blanca está compuesta de la vaina linfática periarterial (PLS) y los centros germinales. Se muestra un PLS cortado longitudinalmente; varios están cortados radialmente. La pulpa roja es la zona de los cordones esplénicos y de los senos. La zona marginal está indicada. En el bazo humano las arterias peniciliares dan la vuelta para irrigar a los folículos germinales (228).

El bazo esta compuesto por: La pulpa roja, que interviene principalmente en la destrucción de los eritrocitos viejos y la pulpa blanca, que contiene al tejido linfoide. (Esquema figura 1.4). La mayor parte del tejido linfoide se dispone al rededor de una arteriola central, formando una especie de vaina que recibe el nombre de vaina linfática periarterial (PLS).

El PLS se compone de áreas de células T y B. Las células B pueden formar folículos "no estimulados" primarios o "estimulados" secundarios, que poseen un centro germinal.

En los centros germinales se encuentran también células dentríticas y macrófagos fagocíticos. Los macrófagos especializados se sitúan en la zona marginal, el área de alrededor del PLS, y junto con las células foliculares dentríticas de los folículos primarios, son los elementos celulares que representan el antígeno a las células B. Los linfocitos pueden entrar y salir del PLS por ramas capilares de las arteriolas centrales en la zona marginal, en la que se encuentran células tanto B como T.

Algunos linfocitos, especialmente los plasmoblastos en maduración, pueden pasar a la roja atravesando la zona marginal por medio de puentes. La pulpa roja se compone de senos y cordones celulares, que contienen macrófagos fagocíticos, plaquetas, linfocitos y numerosas células plasmáticas^{228,229}.

1.1.4. EL HIGADO

El hígado es una glándula en la cual la eritropoyesis tiene lugar durante el periodo prenatal, y esta actividad formadora de sangre puede volverse activar en cualquier momento de la vida del adulto.

La unidad funcional del hígado es el lobulillo hepático en el cual existe una gran red de vasos capilares y de su superficie van convergiendo al centro del lobulillo. Una porción del lobulillo visto a gran aumento encontramos una distribución que se repite: trabécula hepática, luz vascular, pared endotelial, trabécula hepática y así sucesivamente.

La pared que forman los conductos venosos, es una pared endotelial de células de forma aplanada, pero al corte quedan alargadas y anastomosadas entre sí. Estas células tienen una gran capacidad de hipertrofiarse y una actividad macrofágica. Frente a reacciones inflamatorias o infecciosas se hipertrofian y se hacen visibles, y por otra parte son capaces de captar una serie de sustancias que almacenan en su protoplasma como ciertos colorantes, constituyendo estos elementos de las células de Kupffer.

Estas células forman parte del sistema retículo endotelial, en la cual se pueden llevar a cabo tinciones con técnicas como la de impregnación argéntica pues existe una rica red de fibras de reticulina en íntima relación con esta pared endotelial ³⁴.

1.1.5. MEDULA OSEA

La médula ósea, uno de los órganos mayores del cuerpo constituye en los seres humanos el principal lugar de hematopoyesis.

Este órgano produce la serie roja, todas las series granulocíticas, plaquetas, así también es responsable de la producción de monocitos y linfocitos vírgenes no comprometidos, y como órgano reticuloendotelial importante participa en la síntesis de anticuerpos y el reconocimiento de células senescentes y anómalas²²⁹.

Durante el primer año de edad toda la médula ósea es hematopoyética, es decir médula roja, a partir del tercer año de edad se va transformando en médula amarilla. El peso de la médula ósea en el adulto normal oscila entre 1,500 y 3,000 gramos.²²⁹ Al avanzar la edad va disminuyendo progresivamente la cantidad de médula ósea roja, y a los 70 años la médula amarilla comienza a invadir las costillas y esternón. Las vértebras constituyen, los huesos en donde más tiempo se conserva casi integra la médula hematopoyética.

La médula ósea se compone por una médula amarilla constituida casi en su totalidad por células adiposas y tejido conectivo de sostén; así mismo, esta constituida por una médula roja la cual posee en abundancia células hemopoyéticas entre células adiposas y tejido conectivo²²⁹.

La médula ósea hematopoyética así como la grasa derivan de células reticulares éstas forman el armazón o estroma de la médula ósea, entre cuyas mallas radican las células hematopoyéticas cuando la médula es la roja parequimatosa³⁴.

La médula ósea se compone de:

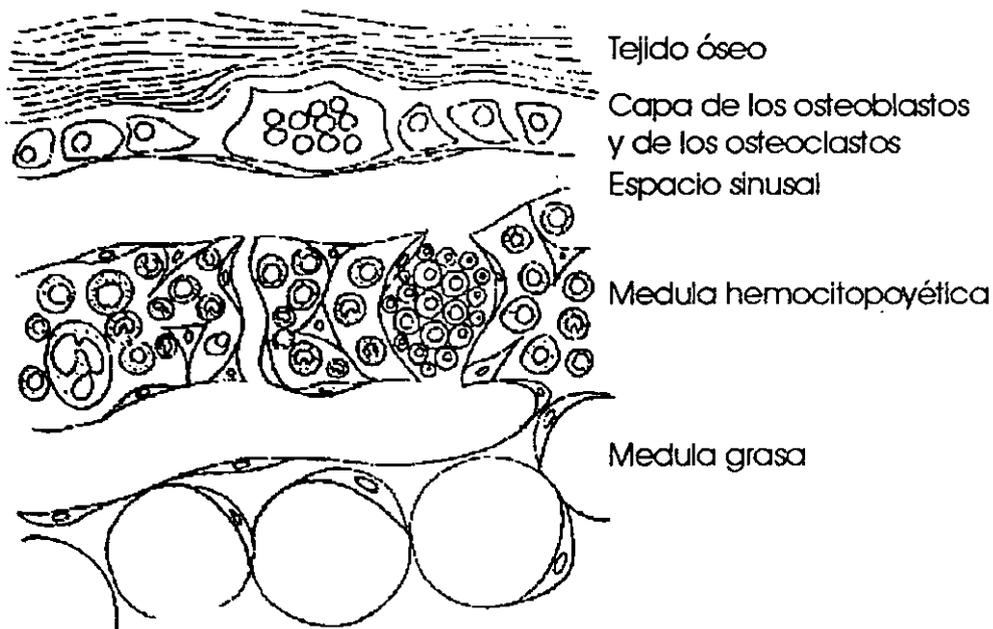


Fig. 1.5. Estructura de la médula ósea; la disposición de los diferentes elementos es muy esquemática. Siguiendo a Sabin, se representa a la eritropoyesis con situación intravascular, y el resto de la hemocitopoyesis de tipo extravascular(34).

- 1) **Endostio.** Encargado de la formación osteoblástica (endostal) y osteoclástica (capaz de originar policarpios).
- 2) **Tejido Adiposo.** De células hinchadas por la abundante grasa de su protoplasma, que desplaza excéntricamente al núcleo.
- 3) **Tejido Reticular.** Este tejido reviste al endostal y forma la armazón estromática de la médula ósea. (Ver figura 1.5)

Desde el punto de vista estructural la médula ósea se compone de células hematopoyéticas alojadas en una trama de vasos y células fibroblásticas ramificadas. Los elementos más distintivos en la vasculatura son los senos venosos, grandes vasos de paredes delgadas que constituyen el sistema de desagüe que transporta células sanguíneas a la circulación. Estos vasos se componen de endotelio y una membrana basal. Su superficie exterior esta revestida de grandes células anchas que se ramifican por el espacio perivascular y proporcionan con ello un andamiaje para las células hemopoyéticas y células asociadas tales como: macrófagos y células cebadas. Estas células ramificadas denominadas células reticulares, ocupan una posición adventicia en los senos vasculares. Sus ramas en el espacio hematopoyético perivascular están estrechamente asociadas con fibras extracelulares (reticulares) que se pueden impregnar distintivamente con plata³⁴.

Estas células reticulares pueden controlar el volumen del espacio hemopoyético; pueden hidratarse y aumentar de volumen confiriendo un carácter gelatinoso y color blanco a la médula, o bien pueden volverse adiposas y crear una médula amarilla con escaso espacio hemopoyético²²⁹.

El parénquima mieloide: Es la estructura directamente responsable de la hematopoyesis en el adulto. Formado por los tres sistemas eritropoyético, granulocitopoyético y trombocitopoyético, se reparte homogéneamente por los diversos huesos que contienen médula roja, reaccionando de un modo unitario³⁴.

Citología Medular General

En la médula se producen diariamente unos 900 millones de hematíes, y leucocitos en proporción menor. Las células de la médula ósea roja normal se clasifican en los siguientes grupos:

- a) Reticulares (plasmáticas, indiferenciadas, linfoides, adiposas, histiocitarias y macrófagos).
- b) Blancas granulocitopoyéticas (mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos y granulocitos en banda o segmentados, neutrófilos, eosinófilos y basófilos.
- c) Rojas eritropoyéticas (Proeritroblastos, eritroblastos basófilos, policromatófilos y ortocromáticos.
- d) Megacariocíticos trombocitopoyéticos (plaquetas).

El principal control de las células hemáticas es ejercido en las células madre. En la médula ósea, las células madre constituyen un fondo de células que se autoperpetúan y de distinta especialización, desde ser multipotenciales o pluripotenciales hasta quedar encargadas de una sola línea celular²²⁹.

Ordinariamente el tipo de división de las células hematopoyéticas de la médula ósea es homoplástica, es decir que las células hijas denotan las mismas características de sus progenitores y solo después, al madurar modifican su morfología y adquieren la capacidad de emigrar a la sangre periférica²²⁹.

1.1.6. TEJIDO LINFÁTICO.

El sistema linfático está repartido por todo el organismo en forma de espacios y vasos linfáticos, por una parte, y formaciones linfoides, por otra. Las formaciones linfoides pueden estar en relación con los epitelios, con los vasos linfáticos o con la sangre, y pueden ser diseminadas (por ejemplo, placas de Peyer) o formar un órgano (como el Bazo).

La unidad anatómico funcional es el folículo linfoide. En el centro del folículo existe una porción clara llamada centro germinativo.

Las funciones del centro germinativo son:

- 1) Linfopoyética, pues sus células centrales presentan gran capacidad reproductora originando linfocitos a medida que van madurando las porciones periféricas.
- 2) Función antigénica, creadora de anticuerpos.
- 3) Acción metabólica, creadora de la linfa.

El folículo linfoide se encuentra en todos los órganos linfoides y estos órganos pueden ser clasificados como:

- 1) Órganos linfoides en relación con epitelios (amígdalas, placas de Peyer, folículos cerrados etc.).
- 2) Órganos linfoides en relación con la circulación linfática (ganglios).
- 3) Órganos linfáticos en relación con la circulación sanguínea (bazo).

Existe una íntima relación entre el sistema linfático y el sistema reticuloendotelial, no solo en los centros linfáticos sino en los senos, cordones linfoides etc. Además de una gran cantidad de células reticulares, redes de fibrillas de reticulina y de haber una coparticipación fisiológica entre estas^{34,228, 229}.

1.1.6.1. Ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos constituyen la parte más importante del sistema linfático, suelen medir de 0.3 a 1.5 cm de diámetro mayor y constan como la médula ósea de un estroma y un parénquima.

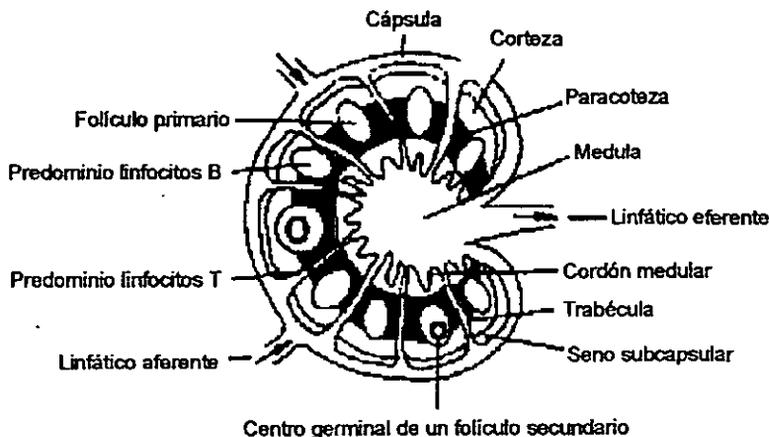


Fig. 1.6. Esquema de la estructura anatómica de un ganglio(180).

La estructura de los ganglios linfáticos en estos órganos podemos distinguir un parénquima linfóide que se distribuye en forma de cordones o folículos y un sistema de senos linfáticos. Además los ganglios en forma de judía, están recubiertos por una cápsula de tejido fibroelástico que permite su distensión (fig. 1,6).

Composición celular de los ganglios linfáticos.

1. *SERIE LINFATICA*. Es la serie predominante entre 90% de las células. Comprende los siguientes tipos:

- a) linfoblastos.
- b) Linfocitos semiadultos.
- c) Linfocitos adultos.

2. *SERIE RETICULAR*. Desde el punto de vista histiológico se debe de considerar:

- a) La célula endotelial que cubre los senos.
- b) La célula estrellada que está en el interior de los senos.
- c) Las células reticulares indiferenciadas que existen entre los linfocitos.

3. *CELULAS LIBRES*. Linfocitos envejecidos, algunos macrófagos, escasos leucocitos neutrófilos, células plasmáticas, algún hematíe, monocitos etc.

Las funciones de los ganglios linfáticos.

- 1) Posee acción linfopoyética activa.
- 2) Regulan la circulación linfática general.
- 3) Formación de anticuerpos.

1.1.6.2. El Timo

Está situado en la parte interior del mediastino. Primitivamente es de tipo epitelial, y tiene un gran desarrollo desde el nacimiento a la pubertad, para después sufrir un proceso de involución pero sin llegar a desaparecer por completo.

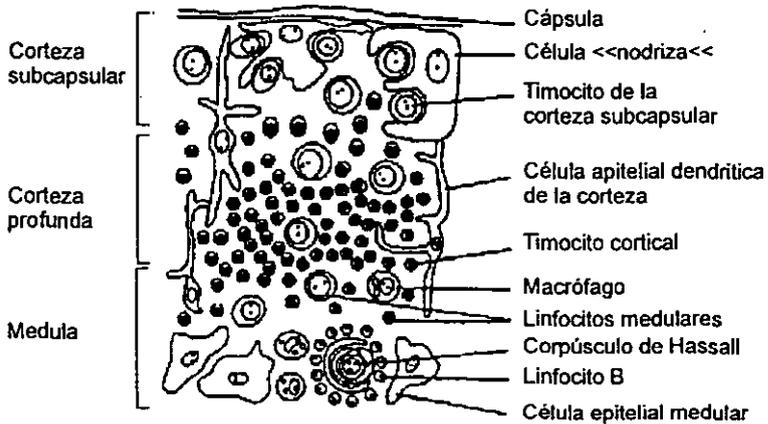


Fig.1.7. Lobulillo tímico con su componente celular(180).

En el niño, el timo lo forman dos masas divididas en lóbulos, cada uno de los cuales presenta una substancia cortical más oscura, y formado por células linfoides adultas, de 6 a 8 micras de diámetro llamadas timocitos. La substancia medular esta formada por células reticulares y timocitos (fig. 1.7)³⁴.

En el seno del timo los linfocitos T (timocitos) maduran y adquieren plena competencia inmunológica. En la zona más periférica o corteza, que constituye un 80% de la glándula tímica, se localizan los timocitos más inmaduros, que tras un proceso de maduración pasan a la zona medular constituida por el 15% restante del timo y formada por linfocitos T que

poseen caracteres de madurez fenotípica y funcional. En este estadio evolutivo el linfocito T adquiere los receptores que fijan los eritrocitos de carnero, con la formación in vitro de las rosetas espontáneas o rosetas E, cuya demostración constituyen la prueba definitiva para identificar a los linfocitos T entre una población mononuclear heteromorfa¹⁸⁰.

El timo representa una fuente importante de células linfoides para otros territorios linfáticos del organismo, y está relacionado con los mecanismos de especificidad inmunológica¹⁵.

1.2. MICROAMBIENTE Y ESTROMA MEDULAR

Ya hemos descrito antes algunos aspectos estructurales de la médula ósea que la conforman; por lo cual, sólo retomamos que la producción celular (hemopoyesis) se lleva a cabo en la porción extravascular de la médula. Esta se encuentra separada de los amplios senos venosos (compartimiento intravascular de la médula) por una sola capa de células endoteliales. Esta capa endotelial, que es acompañada en forma intermitente por una membrana basal discontinua, y células adventicias adyacentes, es el sitio donde se lleva a cabo la emigración transluminal de las células sanguíneas maduras (o en la fase de maduración) y la función endocítica¹⁸³. Las células que constituyen o conforman el estroma de la médula ósea son: células fibroblásticas, células endoteliales y células reticulares; las cuales proporcionan dos funciones importantes; una es la de formar un andamiaje para las células hematopoyéticas. La segunda función importante, es la de participar en la constitución de un microambiente medular hematopoyético; en el que se engloba un conjunto de células (células endoteliales, células reticulares, adipositos y macrófagos derivados

de monocitos), además de sustancias químicas, hormonales, y neurotransmisoras entre otros varios factores menos conocidos. El Microambiente Hematopoyético, ejerce un influjo modificador sobre las células madre y su diferenciación celular hematopoyética.

De esta manera, cada una de las células que conforman el estroma medular tienen funciones muy específicas que permiten mantener un nicho hematopoyético óptimo para la diferenciación y autoperpetuación de las células madre y progenitoras hematopoyéticas.

Los *adipositos* (células almacenadoras de grasa), representan a la progenie de las células reticulares (que derivan de una célula precursora fibroblástica llamada Unidad Formadora de Colonias de Fibroblastos « CFU-F»^{180,317}) que han entrado a una fase extensiva de acumulación y almacenamiento de lípidos.

Los adipositos cumplen ciertas funciones : por ejemplo, podrían servir como reserva local de energía o tener otras funciones que van más allá de la simple ocupación del espacio que no se emplea para la producción de células hemáticas. La adipogénesis y la osteogénesis en el microambiente de la médula ósea están reguladas recíprocamente⁶⁵.

Las *células reticulares* (retículo) del tejido mieloide son unas células grandes y de forma irregular que están adheridas (fijas) al sustrato y que se derivan del mesénquima, producen delicadas fibras reticulares. Aunque aún se desconoce su caracterización adecuada, sin embargo, se sabe que pueden secretar colágena del tipo I y III. Otros rasgos distintivos es que pueden teñirse histoquímicamente, por fosfatasa ácida ó básica

dependiendo de las especies, y que su progenie posee una moderada capacidad fagocítica.

Los *fibroblastos* ordinarios y una células fibroblásticas semejantes, derivadas de las células reticulares, tienen la capacidad de secretar más de un tipo de colágena, así como de fibronectina (proteína componente de la matriz extracelular)²³³.

Las *células endoteliales* son el mayor componente celular en el microambiente de la médula ósea, que regulan el tráfico y el nicho de las células madre y progenitoras hematopoyéticas. En cultivos *in vitro* las células endoteliales de médula ósea en monocapa, producen Interleucina-6, ligando-Kid, factor estimulante de granulomonocitos y granulocítico; lo cual sugiere su participación en la regulación de la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas y en cultivos de largo término iniciadoras celulares por elaboración de citoquinas de linaje-específico¹⁶⁵.

En cultivos de largo término, los cuales mantienen mielopoyesis o linfopoyesis; el contacto entre células progenitoras y células estromales es necesario para mantener el crecimiento y renovación de células madre pluripotenciales. Estos cultivos contienen una mezcla de diversos tipos de células, incluyendo células fibroblásticas y sus derivados (adipositos), células endoteliales, células blanket y macrófagos todas las cuales pueden ser identificadas en tejido hematopoyético. Las líneas celulares con la propiedad de células fibroblastoides o parecidas a endoteliales pueden ser clonadas desde tejido hematopoyético primario y conservar la habilidad para sostener el crecimiento y diferenciación de progenitores hematopoyéticos^{217, 233}.

Las células estromales reservan una matriz extracelular la cual es rica en colágena, fibronectina, laminina y glicosaminoglicanos; lo cual también constituye parte del microambiente hematopoyético²¹⁷.

Ahora bien, los *macrófagos del estroma medular*, juegan un papel muy importante en la regulación de la hematopoyesis. Los estudios pioneros por Bessis y cols., mostraron la existencia de un macrófago central en una isla eritroblástica por lo que se dio el concepto de que los macrófagos actúan como "célula enfermera" para la eritropoyesis por proveer de factores esenciales como la eritropoyetina^{217,228}. Esto se ha demostrado por la presencia de RNAm de eritropoyetina, en experimentos de hibridación in situ. La producción de factores eritroides por los macrófagos, puede ser una explicación de la producción sincrónica de los eritroblastos dentro de "la isla eritroblástica" la cual se ha observado tanto in vivo como in vitro²¹⁷.

Los macrófagos junto con los fibroblastos son capaces de producir una variedad de moléculas denominadas Factores Estimulantes de Crecimiento Hematopoyético o citocinas^{217,228}.

La membrana citoplasmática de los macrófagos establece procesos íntimos de interacción celular (comunicación celular) con una gran proporción de células hematopoyéticas desarrolladas, incluyendo tanto la línea eritroide como mielomonocítica. Tal asociación provee un apropiado microambiente de control de crecimiento celular, diferenciación y movimiento. Los macrófagos son también fuente importante de interleucinas (IL-1 y IL-6), las cuales actúan sinérgicamente con los factores de crecimiento hematopoyético; y Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), el cual puede inducir la secreción de factores de crecimiento por

otras células estromales. Además los macrófagos son capaces de secretar potentes inhibidores de la diferenciación de progenitores y células madre tales como: Interferón α/β ($\text{INF}\alpha/\beta$), $\text{TNF-}\alpha$, Factor de Crecimiento de Transformación β ($\text{TGF-}\beta$) e inhibidor de células madre hematopoyéticas^{154,161,217,228}

El microambiente hematopoyético es esencial para el mantenimiento del steady-state (estado estable) de la hematopoyesis tanto in vivo como in vitro y tal equilibrio puede darse gracias al contacto célula-célula entre estroma y progenitores hematopoyéticos para regular la hematopoyesis.

Este contacto célula-célula puede estar dado a través de moléculas de adhesión o ligandos y moléculas receptoras; el proveer un medio para la comunicación celular directa podría en un momento dado (1) favorecer concentraciones locales de factores reguladores secretados por célula, (2) permite el control de calidad de la diferenciación de células hematopoyéticas por permitir el reconocimiento y fagocitosis de células defectuosas o apoptósicas (p. ej. células B), y (3) es importante también en la regulación del movimiento y egreso de diferenciación de precursores de tejido hematopoyético a la sangre periférica^{161,201,217}.

Uno de los primeros investigadores quien demostró la presencia de células fibroblásticas con potencial osteogénico en el estroma de la médula ósea del ratón, fue Friedenstein y colaboradores, sus experimentos mostraron que el trasplante de esas células del estroma podrían allanar el camino para transferir con éxito el microambiente hematopoyético¹¹. Posteriormente Dexter y colegas desarrollaron un sistema de cultivo a largo término que permite mantener la hematopoyesis in vitro el cual contiene

una capa de células estromales junto con las células hematopoyéticas^{22,1499,228,233}.

En cultivos líquidos Dexter se ha estudiado cada uno de los componentes celulares del estroma, con la finalidad de conocer su función biológica, en la producción de factores de crecimiento y en la regulación de la hematopoyesis; se han empleado anticuerpos monoclonales como el ASTRO-1 específico para precursores estromales, que permite aislar cada componente^{161,195}.

El componente estromal del sistema murino consiste en macrófagos, células hematopoyéticas, fibroblastos, células endoteliales y "células reticulares". A través de éstos sistemas (Golden Srian) han sugerido que las células de médula adherentes in vitro no solamente soportan la hematopoyesis con diferenciación predominantemente granulocítica sino así mismo pueden actuar activamente suprimiendo la diferenciación²²⁸.

El estudio del estroma medular por medio de cultivos de corto y largo término, ha llevado a explicar diferentes malignidades hematológicas; como la anemia aplásica y los síndromes dishemopoyéticos; en los que en su conjunto se ve involucrado el microambiente hematopoyético¹⁴¹.

1.2.1. IMPORTANCIA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

En el organismo humano existen varios tipos de matrices extracelulares, cada una de ellas especializadas en una función en particular²⁵. La matriz extracelular es el espacio intracelular que hay entre cada una de las células que conforman todo el sistema hematopoyético. Las células del estroma medular y las células hematopoyéticas guardan

una matriz extracelular especializada la cual permite unir varios factores de crecimiento y por tanto proporciona permanentemente señales abundantes a las células con las cuales contacta²⁵.

Las células del estroma segregan unos componentes que forman la «matriz extracelular»: fibronectina, laminina, colágeno y glucosaminoglucanos entre los más representativos.

Uno de los mecanismos por los cuales las células progenitoras hematopoyéticas normales permanecen localizadas en la médula ósea como un microambiente, involucra la adhesión de éstas células a proteínas de la matriz extracelular, por ejemplo, el colágeno tipo I, III y IV. Son las proteínas de la matriz extracelular en médula ósea más abundantes y son producidas por fibroblastos así como hoy en día se conoce que las células endoteliales también las producen. El colágeno tipo I y III proveen la armazón estructural de los compartimientos o nichos en los cuales las células hemopoyéticas se alojan^{25,233}.

Existen por lo menos doce tipos de colágeno, sin embargo el colágeno tipo I, en estudios realizados por Michael K. y colaboradores, se demostró que es una proteína adherente en médula ósea normal para células progenitoras mieloides demostrando enlaces específicos (46% \pm 8% para el día 7 y al día 14 del 47% \pm 12% de las Unidades Formadoras de Colonias Granulomonocíticas CFU-GM). También la línea de Unidades Formadoras de Burst Eritroides (BFU-E), mostró enlaces significativos con las proteínas de membrana externa (40% \pm 10%). En neutrófilos y monocitos maduros de sangre periférica, se encontraron enlaces a el colágeno tipo I (25% \pm 8% y 29% \pm 6% respectivamente). Estos datos

sugieren que el colágeno tipo I puede jugar un papel importante en la localización de progenitores comisionados mieloides y eritroides dentro del microambiente de la médula ósea¹⁰⁰.

La *fibronectina* es una glucoproteína de la matriz extracelular que se une no tan solo al colágeno y a los proteoglicanos, sino también a receptores específicos de la superficie celular. Esta proteína junto con la *laminina* son importantes para la organización de otros componentes de la matriz, y también para regular la unión de las células a la matriz, la migración celular y la forma de la célula. El papel principal de la fibronectina es unir las células a diversas matrices extracelulares. La presencia de la fibronectina en las superficies de las células no transformadas, y su ausencia en las transformadas (o tumorogénicas), lleva en principio a la identificación de la fibronectina como una proteína de adhesión²⁵.

La fibronectina posee lugares de unión de alta afinidad específicos para receptores de la superficie celular, conteniendo el péptido universal de adhesión arginina-glicina-ác. aspártico (RDG) es la estructura mínima requerida para el reconocimiento de las células hematopoyéticas al colágeno, fibrina, proteoglicanos sulfatados y factores de crecimiento; también muestra enlaces específicos entre células precursoras eritroides y células estromales²²⁸.

Los *proteoglicanos* son un grupo de moléculas asociadas a la matriz extracelular y en la superficie de las células estromáticas. Contienen una proteína nuclear a la cual se une covalentemente uno o más polisacáridos conocidos como glucosaminoglicanos. Los glucosaminoglicanos son largos polímeros lineares repetitivos de disacáridos específicos;

generalmente un azúcar es un ácido urónico y el otro es N-acetilglucosamina. Uno o ambos azúcares contienen uno o dos residuos de sulfato. Los proteoglucanos se denominan según la estructura de su disacárido respectivo principal; tales como: condroitin sulfato, ácido hialurónico y heparán sulfato^{25,78}. Ellos son sintetizados por células del tejido hematopoyético, principalmente por células del estroma, y son liberados al espacio extracelular. Recientemente han llamado la atención debido a que existen evidencias de que estos pueden extraer selectivamente y enlazar factores de crecimiento; así como proveer de una alta especificidad en el reforzamiento de las uniones entre células progenitoras y el estroma medular; modulando la hematopoyesis (Gordon et. al. 1986).

Otros proteoglicanos pueden ser instrumentos de la anidación de las células madre hematopoyéticas; otra clase de proteoglicanos puede estar relacionada con el desarrollo de la regulación de las células eritroides. También se encontró que las células progenitoras hematopoyéticas, sintetizan una cantidad considerable de condroitin sulfato (CS) que primero esta asociado a la membrana y posteriormente es liberado al espacio extracelular. Cuando estas células progenitoras forman un capa sobre una superficie de células estromáticas estas se encuentran unidas, o anidadas a las células estromáticas; lo cual se asocia a una estabilización de la membrana asociada a CS. El tiempo de vida de éstas moléculas sobre la membrana es prolongado. Estos estudios han demostrado que membranas asociadas a CS pueden por lo tanto, mediar el enlace de progenitores hematopoyéticos a células estromáticas. Este enlace ocurre vía la

interacción entre membranas asociadas a CS sobre células progenitoras y membranas asociadas a fibronectina (FN) sobre células estromales^{201,204}.

Estas uniones intercelulares son un fenómeno complejo que involucra interacciones múltiples moleculares. En el que están involucradas las diferentes membranas celulares del sistema hematopoyético (estroma) y la matriz extracelular quienes en su conjunto forman el microambiente inductivo hematopoyético. (ver fig. 1.8)

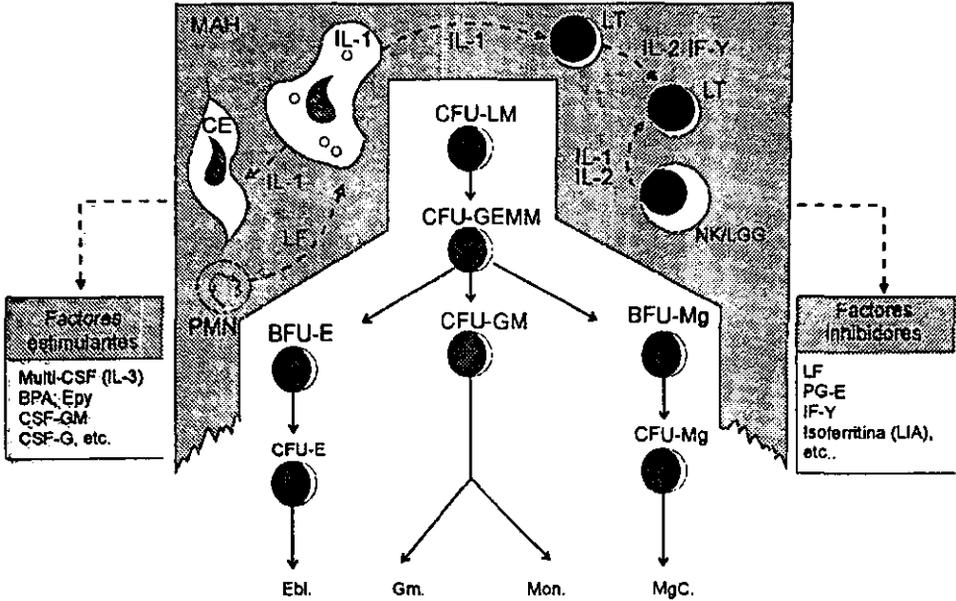


Fig. 1.8. Progenitores hematopoyéticos y su microambiente(183).

CAPITULO 2

CELULAS MADRE (STEM CELL) Y PROGENITORES HEMATOPOYETICOS

La hematopoyesis humana forma un complejo ecosistema de poblaciones celulares en la médula ósea, distribuyéndose en ella las células hematopoyéticas en dos principales compartimentos morfológico-funcionales bien diferenciados^{85,183} :

- a) Compartimiento de células madre o de división.
- b) Compartimiento de maduración y diferenciación.

2.1. COMPARTIMIENTO DE CELULAS MADRE (STEM CELL) O DIVISION

El sistema celular sanguíneo diariamente presenta un número importante de muerte celular, dado que las células sanguíneas maduras tienen un tiempo finito de vida y cada una de ellas son completamente incapaces de replicarse. Por lo tanto, las células como los eritrocitos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, monocitos y granulocitos son denominados "terminalmente diferenciados". Estas células al completar su tiempo de vida tendrán que ser reemplazadas por otras para que el organismo mantenga bajo condiciones de steady- state (estado estable) el

conteo sanguíneo celular en humanos normales y así mismo que la médula ósea produzca aproximadamente 10^{10} células por día normalmente.

Para poder regular dicha situación será importante que los rangos de producción y de envejecimiento celular deban ser iguales; y esto será posible gracias al compartimiento del sistema de Células Madre Hematopoyéticas (Stem-Cell), también conocida como : células tallo, células totipotenciales, células pluripotenciales, células tronco y células germinales o seminales ^{132,201}.

El sistema de células madre hematopoyéticas produce el sistema leucocitario además de eritrocitos y plaquetas , así como algunas células que no necesariamente se empleaban en las definiciones comunes del sistema hematopoyético, como son los basófilos tisulares, los osteoclastos, y todo el sistema de macrófagos (histiocitos , células de Kúper y otras), que se localizan en varias cavidades y tejidos corporales (sistema retículo endotelial) ²⁰.

Para la producción de células nuevas el sistema hematopoyético emplea el proceso de mitosis, por medio del cual se duplica la cantidad de DNA y de algunos componentes (no todos), para que mediante mitosis se produzcan dos células hijas que serán idénticas a la célula madre original²⁰.

Sin embargo, el sistema de células madre hematopoyéticas responde sólo bajo ciertos agentes específicos ambientales para activar el mecanismo mitótico y así mantener el conteo sanguíneo de líneas celulares específicas en diferentes tiempos. Así por ejemplo, la producción de eritrocitos puede ser predecible que se incremente en el estado de hipoxia, pero la producción de neutrófilos no. Por el contrario en pacientes quienes

tienen un proceso infeccioso adquirido, la producción de neutrófilos se incrementa pero la producción de eritrocitos no. Estas respuestas específicas lineales, son dirigidas por tres categorías genéricas de competencia celular: 1) las células madre hematopoyéticas deberán tener la capacidad para pasar de células progenitoras comisionadas a una línea hematopoyética en particular; 2) la capacidad de células progenitoras de una línea para llevar a una progenie diferenciada; 3) el organismo debe tener la capacidad para percibir estímulos ambientales para generar "señales" extra e intracelulares que repriman éstas vías de diferenciación²⁰¹.

La producción de células sanguíneas en tejido hematopoyético involucran el establecimiento de una embriogénesis temprana de células madre hematopoyéticas pluripotenciales ²⁰¹.

Así mismo, las características que definen cualquier célula madre son: su gran capacidad de AUTORREPLICARSE, y cuando la célula madre hematopoyética es funcional, su capacidad para DIFERENCIARSE ^{20,122}.

Estas células pluripotenciales no están comisionadas en sí a una línea específica, sino que funcionan como precursores hematopoyéticos, que al dividirse, mantienen así un compartimiento desde un punto de vista funcional aunque no anatómico de células similares pluripotenciales. Algunas células germinales se mantienen inmutables en el compartimiento germinal en nichos hematopoyéticos por toda la vida del mamífero, mientras que otras son estimuladas y se convierten en elementos unipotenciales que dan lugar a distintos tipos de células sanguíneas ^{20,228}.

Se ha observado que en ratones irradiados letalmente, al inyectarles células de la médula ósea son capaces de reconstituir el sistema hematopoyético de dichos animales.

Ahora bien, morfológicamente hablando, las células de éste compartimiento (menos del 1 % del total de células madre) no son identificables, denominadas células progenitoras o células germinales, las cuales asemejan a linfocitos pequeños²⁰.

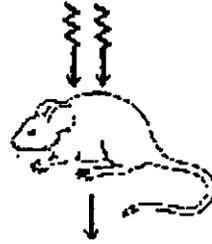
Estas células pueden ser cuantificadas in vitro porque en medios semisólidos (agar o metilcelulosa) forman colonias que son reconocidas morfológicamente como progenie diferenciada.

Aunque muchos estudios están basados en modelos de murinos, éstos mismos son altamente relevantes a la fisiología celular humana. Por ejemplo, virtualmente los ensayos in vitro para células progenitoras hematopoyéticas derivan de métodos establecidos usando células murinas²⁵.

En realidad la primera evidencia clara de la existencia de células madre hematopoyéticas derivó de estudios realizados por Till y Mc Culloch (1968), quienes describieron la existencia de las Unidades Formadoras de Bazo (CFU-S por sus siglas en inglés), las cuales se ponen de manifiesto en los ensayos realizados en ratones irradiados letalmente y transfundidos con médula ósea singénica, al cabo, de unos días (9-14), en el bazo de estos ratones aparecían colonias de células hemáticas en especial tres series: eritrocítica, granulocitos y plaquetas, en varias etapas de diferenciación. (ver fig. 2.1)^{20,34,129,201,228,233}.

Estudios subsecuentes demostraron que cada una de éstas colonias de bazo derivaban de una célula progenitora hematopoyética única y pluripotencial ahora conocida como la CFU-S (Unidad Formadora de Colonias de Bazo) o CFU-C (Unidad Formadora de Colonias de Cultivo). Las CFU-S representan un modelo importante de la fisiología de las células madre. Las células CFU-S o CFU-C según se produzcan en colonias esplénicas o en agar. La célula germinal multipotencial es la CFU-S, mientras que las CFU-C son las dirigidas a la formación de células sanguíneas que necesitan Factores Estimulantes de Colonias (CSF por sus siglas en inglés) para proliferar. La diferenciación para CFU-S y CFU-C no es únicamente conceptual, ya que las CFU-S comparten un antígeno presente en el cerebro del ratón, distinto del antígeno θ , que no poseen las células CFU-C. Por otro lado las CFU-C son más densas y muchas de ellas se encuentran en la fase S del ciclo celular ^{122,129,164}.

Los rayos X detienen la producción de células sanguíneas el ratón moriría si no recibiera ningún tratamiento posterior



Proliferación de células de médula ósea procedentes de un donante sano



El ratón sobrevive 2 semanas después de la inoculación, numerosas células sanguíneas sanas se encuentran en circulación



El examen del bazo revela la presencia de nódulos no habituales en su superficie.



Cada nódulo del bazo contiene un clon de células hematopoyéticas descendientes de una de las células de médula ósea inoculadas.

Figura 2.1 Esquematiza la presencia de una célula germinal en el ratón. (25)

En ratones irradiados a los que se les administra infusiones de células provistas de marcadores cromosómicos generan células sanguíneas con el mismo marcador; por lo que, las células derivadas son clonales. También el cromosoma Philadelphia es un marcador característico, que se encuentra no sólo en los granulocitos leucémicos, sino también en los megacariocitos, en los normoblastos, y en los monocitos lo cual nos habla de la existencia de una célula germinal pluripotencial ^{131,228}.

Existen otros estudios los cuales han servido de modelo en forma importante tanto en murinos como en humanos, que demuestran la participación de una célula madre . Así, por ejemplo, los ratones con supresión endógena de eritropoyetina o ratones a los que se les inyectó anticuerpos anti-eritropoyetina, producía disminución de la línea eritroide, pero, aumentaban las células indiferenciadas.

Otro modelo de daño a nivel de la célula madre es la neutropenia cíclica en el perro Colli gris en el que existe un desorden en la velocidad de producción de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, reticulocitos y plaquetas todas cíclicas. El ciclo dura alrededor de 11 días para cada tipo celular , pero todos los ciclos están fuera de fase uno de otro. Esta enfermedad recesiva produce infecciones y muerte prematura ; por lo que se determina que existe una deficiencia en el compartimiento de células germinales no comprometidas. Dunn y cols., (1977;1978) han demostrado que la fluctuación cíclica de cada línea celular afectada es paralela a la variación en los niveles de Actividad Estimulante de Colonias (CSA) y CFU-C medidos por la técnica de la cámara de difusión. Además, la "hematopoyesis cíclica canina" puede ser corregida a través de un trasplante de médula ósea demostrando que el defecto puede existir a

nivel de células madre. Los ciclos de éstos animales pueden ser eliminados temporalmente por endotoxinas y tratamientos con litio, posiblemente por normalización de las células madre pluripotenciales^{129,228}.

Un desorden similar existe en humanos en el cual la neutrofilia, monocitos, linfocitos, reticulocitos, y plaquetas las cuales también son cíclicas tienen un intervalo de tres semanas; la forma adulta puede representar un desorden clonal de células Natural Asesinas (NK). La terapia se hace con esteroides en días alternados, normalizando los ciclos y previene de posibles infecciones a algunos pacientes con neutropenia cíclica²²⁸.

Normalmente sólo una pequeña fracción de las células del compartimiento celular están en mitosis, pero esta fracción es suficiente para mantener un estado constante en la población de las células sanguíneas²⁰. El compartimiento normal de las células madre hematopoyéticas tiene un tamaño constante, lo que refleja un equilibrio que existe entre autorreproducción, diferenciación y muerte celular. Si hay un compartimiento precursor como parece haberlo, para todas las células madre hematopoyéticas (CMH) menos para la célula madre hematopoyética totipotencial (CMHT) más primitiva, la regulación a partir del compartimiento precursor se transforma en una variable adicional (quizá es un sistema de apoyo primario para utilizarse en caso de urgencia). Muerte y diferenciación son sinónimos desde el punto de vista cinético en los compartimientos de la célula madre; ambos fenómenos impiden la autorreproducción. En la figura 2.2 se observa el efecto que tienen las diferentes relaciones entre autorreproducción y diferenciación sobre el tamaño del compartimiento de las CMH. Existe una regulación para todos

los compartimientos de CMH excepto para la CMHT aunque ésta puede ser sólo intermitente. Sin embargo, debido a dicha regulación, la diferenciación (y la muerte) en condiciones normales, deben exceder a la autorreproducción en los compartimientos post-CMHT. El compartimiento de células germinales por lo tanto debe considerarse como una entidad funcional más que anatómica, ya que las células germinales multipotenciales se encuentran no sólo en médula ósea sino también en la sangre ²⁰.

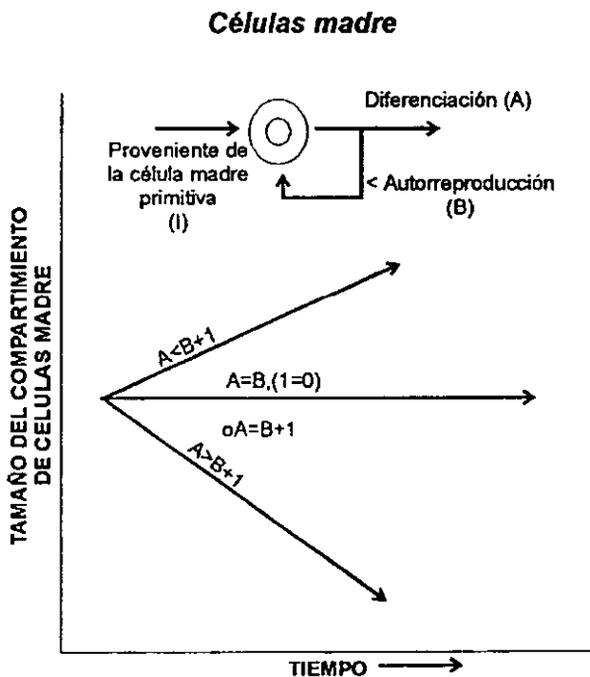


fig. 2.2. Relaciones entre el tamaño del compartimiento y el balance de entrada, autorreproducción y diferenciación(6).

Existen otras evidencias que nos hablan de la existencia de una célula madre multipotencial, así, por ejemplo, del transplante de células de colonias esplénicas de un solo tipo celular se obtienen colonias de tipo celular puro o mixto, lo cual indica que la colonia original también contenía células no comprometidas e incluso células germinales multipotenciales. Por otro lado, Trentin y cols., (1971), demostraron que también es posible repoblar órganos linfoides depleccionados con células procedentes de colonias esplénicas hemopoéticas y que los nuevos linfocitos son capaces de producir inmunoglobulinas de tipo B o T²²⁸.

Por tanto, se concluye que la célula germinal CFU-S es verdaderamente multipotencial. En la figura 2.3 se muestra el modelo sobre el origen de los distintos tipos celulares y sus compartimientos⁸⁵.

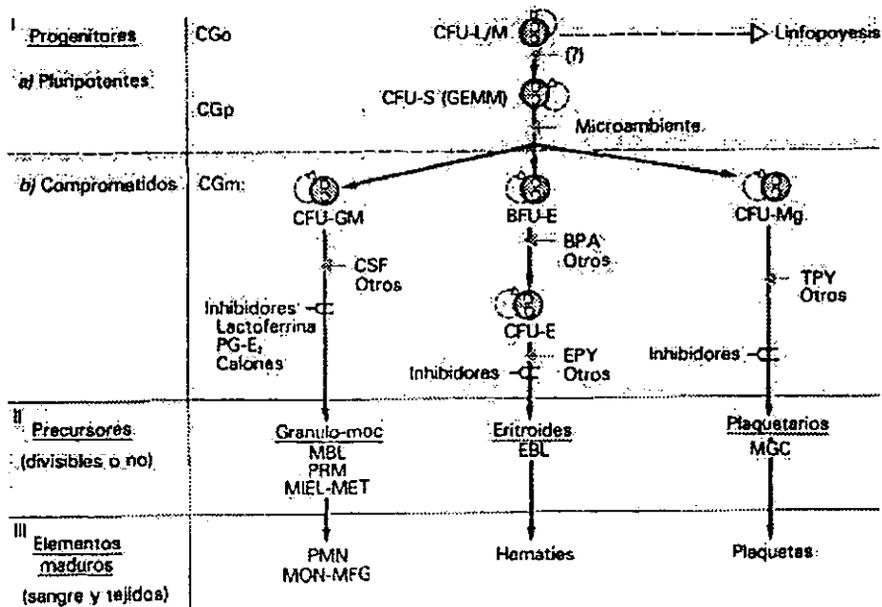


fig. 2.3. Vertiente mieloide de la hematopoyesis. CG0 (célula germinal), CGp (célula pluripotencial mieloide) y CGm (células progenitoras monovalentes ó "comprometidas"). (183)

La hemopoyesis la conforma un conjunto de poblaciones de células progenitoras o germinales las cuales para su estudio se han dividido en tres categorías ordenadas y de diferente significado biológico. La primera es un pozo de reserva de células madre autorregenerativas. La segunda esta compuesta por células progenitoras en diferenciación (células comprometidas ó comisionadas) las cuales están relacionadas con linajes celulares específicos y tienen una capacidad limitada o virtualmente no detectable para autorregenerarse. La tercera comprende la población de células hematopoyéticas compuesta por células sanguíneas maduras y funcionalmente completas ^{85,233}.

La población de progenitores o células germinales (CG) denominadas también "unidades formadoras de colonias" por su capacidad clonogénica in vitro , se despliega en un sentido jerárquico descendiente desde elementos pluripotenciales mieloides Celulas Germinales Pluripotentes (CGp), con capacidad diferencial polivalente "granuloeritromonomegacariocítica" (CFU-GEMM), hasta progenitores univalentes o monovalentes (CG_m) o "comprometidas" en cada una de las líneas celulares específica: eritroblástica (CFU-B y CFU-E), granulomonocítica (CFU-GM) y megacariocítica (CFU-Mg) en la tabla 2.1 se muestran las distintas células y su terminología ⁸⁵.

TABLA 2.1 TERMINOLOGIA Y ABREVIATURAS DE LAS CELULAS MADRE HEMATOPOYETICAS CONOCIDAS⁸⁵.

CFU ó CFU-ML	Célula madre pluripotencial mieloide y linfoide.
CFC ó CFU-L	Célula madre linfoide
CFC ó CFU-GEMM (CFU-S)	Célula madre multipotencial mieloide para granulocitos, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y megacariocitos.
CFC ó CFU-GM	Célula madre bipotencial comprometida para granulocitos y monocitos.
CFC ó CFU-G	Célula madre unipotencial comprometida para granulocitos.
CFC ó CFU-M	Célula madre unipotencial comprometida para monocitos.
CFC-GM	Célula formadora de agregados o <i>clusters</i> granulomonocíticos.
BFC ó BFU-E	Célula madre unipotencial o comprometida eritroide en <i>burst</i> .
CFC ó CFU-E	Célula madre unipotencial o comprometida eritroide.
CFC ó CFU-E_o	Célula madre unipotencial o comprometida para eosinófilos.
CFC ó CFU-B	Célula madre unipotencial o comprometida para basófilos.
CFC ó CFU-Mk	Célula madre unipotencial o comprometida para megacariocitos (y plaquetas).

CFC célula formadora de colonias, CFU unidad formadora de colonias.

En cierta forma se acepta que antes del escalón de progenitores plurivalentes mieloides (CFU-GEMM), existe un primer nivel de progenitores omnivalentes (CG_o) con capacidad evolutiva tanto mieloide como linfoide (CFU-LM).

Este escalonamiento no se dispone en forma brusca como se muestra en la figura 2.3, sino que existe una secuencia fluida de poblaciones germinales que a lo largo de su evolución ontogénica, van adquiriendo

receptores celulares de membrana cada vez más específicos o comprometidos, existiendo formas intermedias con capacidad clonogénica "bivalente" ¹⁸³.

El segundo escalón lo comprenden el gran compartimiento de precursores mieloides, morfológicamente reconocibles como tales. Los más jóvenes tienen capacidad divisible (mieloblasto, promielocitos, mielocitos y promonocitos; eritroblastos y megacariocitos maduros), mientras que los más maduros carecen de capacidad mitótica (metamielocitos, eritroblastos y megariocitos maduros).

El tercer escalón citofuncional de la hematopoyesis lo integran la mezcla de elementos maduros que atraviesan la barrera médula sangre para alcanzar el torrente circulatorio (granulocitos y monocitos, hematíes y plaquetas) ¹⁸³.

Se conoce que el estímulo para la diferenciación y proliferación de cada línea celular está mediado por inductores glicoproteicos (citocinas) como la eritropoyetina, trombopoyetina etc., es probable que la proliferación de las células germinales no comprometidas no dependa de esos inductores glicoproteicos. Así por ejemplo, la eritropoyetina en la serie eritroide no actúa sobre las células germinales no comprometidas, sino sobre una célula germinal comprometida la cual capta la señal de la eritropoyetina, que se separa de la célula pluripotencial germinal.

De ésta manera los sistemas celulares que forman el substrato de la hemopoyesis albergadas en el estuche medular óseo al amparo de un lecho celular y fibrilar rodeado por un microambiente inductor de la hematopoyesis ^{129,233}.

Por otro lado, el desarrollo de colonias hemopoyéticas en el bazo y la médula ósea de animales irradiados a demostrado que los distintos tipos de colonias muestran una especial predilección por localizarse según una distribución geográfica característica en el órgano huésped.

En el bazo de ese huésped, la zona subcapsular favorece la formación de colonias eritroides, mientras que el parénquima más profundo y la médula ósea favorecen la diferenciación granulocitaria, tal situación es probable que no se de al azar sino que, que la línea de diferenciación esté inducida por la naturaleza del ambiente en que se encuentra la propia célula germinal no comprometida. Esta inducción en la que interaccionan diferentes tipos de células y sustancias reguladoras en feeb-back son tema de continuo estudio y de gran interés. Para tal interacción celular por lo tanto, es importante considerar la naturaleza de las membranas de las células formadoras de colonias, sus receptores y su matriz extracelular

129,228

2.1.1. ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LA CELULA MADRE

Con la intención de aislar células madre murinas por métodos inmunológicos, a través de un gran número de ensayos sobre la caracterización de los antígenos de superficie celular (p. ej. CD 34) en células primitivas y usando otros antígenos de superficie, a los que se les ha encontrado en células comisionadas para una línea específica, ha sido posible caracterizarlas. Una batería de anticuerpos puede ser utilizada para identificar y (contra seleccionar) células que expresen marcadores de líneas específicas (lin+). La validación de que una célula dada sea una célula madre humana es más difícil que en modelos murinos. El fenotipo de una

célula madre humana puede ser deducido en estudios in vitro; en células formadoras de colonias que producen colonias que contienen una cantidad de formas blásticas. Cuando éstas células son retiradas del cultivo y sembradas en cultivos secundarios y terciarios las colonias celulares tienen así mismo células progenitoras multilineage.

Terstappen y cols., usaron una variedad de anticuerpos monoclonales para identificar el fenotipo de éstas CFUs blasticas y observaron que las células fueron CD34+/CD38-. Anteriormente, Curt Civin y su grupo habían aislado un anticuerpo monoclonal que reconoce una línea celular leucémica llamada "KG-1" y que se demostró eficaz para definir a la célula madre humana, al reconocer un antígeno llamado CD 34 que se haya en células pluripotentes primitivas y en otras precursoras de la sangre. Este antígeno CD34 es una glicoproteína de 110 Kda (kilodaltons) codificada por un gen sobre el cromosoma 1q humano y es expresada en la superficie celular de progenitores hematopoyéticos medulares humanos (1-4%), y también es expresado por un 30% de las células leucémicas de pacientes con leucemias mielocíticas o linfocíticas agudas con un alto porcentaje de blastos, además, se expresa en células madre de primates no humanos así como, en células endoteliales capilares.

El antígeno CD38 es una glicoproteína de 45 Kda cuya función se desconoce. Este está expresado por todas las líneas hematopoyéticas^{86, 201}.

Las células CD34+/CD38- de médula ósea humana sembradas a una densidad de una célula, dan lugar a colonias primitivas en 28 a 34 días después de clasificarse (después de 14 días en el medio que contiene eritropoyetina, GM-CSF, G-CSF, IL-6, y IL-3). Más importante aún, durante

los periodos de cultivo por arriba de cuatro meses y hasta cinco generaciones secuenciales de clonas fueron vistas después de replantear células de éstas colonias primitivas.

Estos hallazgos representan otros reactivos promisorios, que pueden ayudar en la completa caracterización de células madre hematopoyéticas humanas, incluyendo anticuerpos a c-kit (para selección positiva) y CD33 (para selección negativa). Así mismo ha sido posible su aislamiento, movilización, purificación y expansión¹⁷⁷.

La célula progenitora pluripotente mieloide (CFU-GEMM) expresa HLA-DR y es positiva para el CD33 y CD34. Cuando adquiere compromiso hacia la línea granulomonocítica y pasa a CFC-GM, además del CD33 y del CD34, expresa el CD13, antígeno que conserva durante toda su maduración a granulocito maduro, por lo que se le considera marcador de línea. La línea monocítica tiene como marcador específico el CD14. Los progenitores eritroides BFU-E y CFU-E comparten el CD33 y el CD34 con la glicoforina A que conserva durante su evolución madurativa hacia el hematíe.

Los progenitores megacariocíticos CFU-Mg comparten el CD33 y CD34 con el CD61 y CD41 que se expresa durante toda su maduración. El promegacarioblasto adquiere un nuevo antígeno, el CD42, que junto con los otros dos permite identificar la línea megacariocítica. El antígeno HLA-DR se halla en estadios muy tempranos de diferenciación de la CFU-GEMM y desaparece en estadios tempranos de diferenciación excepto en la serie monocítico-macrófago en la que permanece hasta los elementos maduros

.131,180,201

En la figura 2.4 se muestra el fenotipo del antígeno de superficie de células madre o células tronco y progenitoras y progenie relacionada en la hematopoyesis ^{131,201}.

Las células de la médula ósea que expresan el antígeno CD34 son claramente un grupo heterogéneo, como queda demostrado al estudiar el fenotipo celular por citometría de flujo.

Aunque las cifras exactas pueden variar algo de laboratorio a laboratorio las células CD34+ demuestran tener marcadores para linfocitos T, linfocitos B y células mieloides en la siguiente proporción aproximadamente: HLA-DR+ (85%), CD19+(86%), CD33+(70%), CD71+(40%), CD38+(70%), AGA (20%), CD7+(5%), CD10+ (5%)
11,86,122,135, 151

Para fines clínicos, con objeto de poder repoblar, eficientemente y a largo plazo, la médula de pacientes sujetos a terapia mielosupresiva parece ser que el injerto de las células verdaderamente totipotenciales son piedra angular

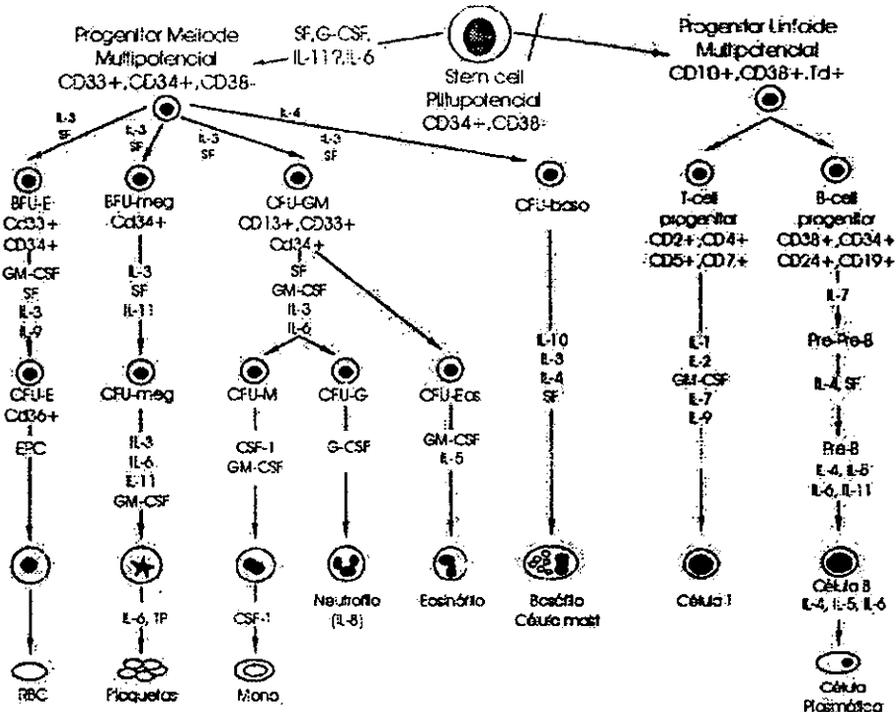


Fig. 2.4. Diagrama que ilustra la relación jerárquica entre las células entre progenitores multipotenciales y pluripotenciales de la líneas mieloide y linfode, algunos de los factores de crecimiento que influyen en el crecimiento de las células en estos estados de diferenciación, y algunos de los antígenos de superficie importantes expresados por las células madre y las células progenitoras. TdT=deoximbonucleotidil transferasa terminal SF= Factor Steel; EPO= eritropoyetina CSF-1= M-CSF; TP= trombotopoyetina; Mono= monocito; RBC= células rojas sanguíneas (201).

2.2. COMPARTIMIENTO DE MADURACIÓN Y DIFERENCIACIÓN

A partir de las células madres comprometidas o unipotenciales se producen las células precursoras morfológicamente reconocibles de cada línea celular: siendo estos precursores eritroideos o eritroblastos, precursores granulocíticos o granulocitos inmaduros, precursores

plaquetarios o megacariocíticos, y precursores linfáticos o linfocíticos. Empezaremos hablando de los precursores eritroides ó eritroblastos ⁸⁵.

2.2.1. PRECURSORES ERITROIDES

Los hechos que caracterizan a estas células son dos fundamentalmente: la hemoglobinización progresiva y la reducción del tamaño nuclear hasta su pinocitosis y expulsión final para dar lugar a la célula roja funcional anucleada o hematíe. Se distinguen los cinco estadios siguientes:

1. **Proeritroblasto.** Sinonimias: macroblasto (Naegeli), macronormoblasto (Undriz), eritogonia (Dameshek), megaloblasto (Sabin y ciertos autores franceses), pronormoblasto (Wintrobe).

Célula de tamaño relativamente grande (diámetro de 20-25 micras), el contorno de esta célula es redondeado a menudo deformado por los contactos, tiene una alta relación nucleocitoplasmática (escaso citoplasma) y basofilia intensa por alto contenido de RNA; pueden mostrar algún nucléolo y la inmadurez cromatínica es manifiesta ^{34,85,228,229}.

2. **Eritroblasto basófilo.** Sinonimias: macroblasto (Pappenheim), eritroblasto primario (Sabin), normoblasto primario (Whitby y Britton), normoblasto tipo A (Israëls), normoblasto basófilo (Wintrobe). El diámetro de esta célula va de 16-18 micras. El protoplasma es intensamente basófilo, más azul aún que el del proeritroblasto, siendo el carácter más distintivo de esta célula, tiene un núcleo algo menor y generalmente sin nucléolos, La cromatina es bastante laxa,

pero empieza a condensarse en grumos grandes, por lo cual su tono generalmente es bastante obscuro ^{34,85,228,229}.

3. Eritroblasto policromatófilo. Sinonimias: normoblasto policromatófilo (Windrobe), normoblasto intermedio (Whitby y Britton), eritroblasto tardío (Sabin), normoblasto tipo B (Israëls). Su diámetro es de 12-15 micras. Su protoplasma es abundante, habiendo perdido en parte su basofilia, y, va adquiriendo la tonalidad rosa por la incorporación de hemoglobina en su masa, en total el color del protoplasma es grisáceo, mezcla en diferente proporción del azul y del rosa. El núcleo y el tamaño celular son algo menores. Nunca contiene nucléolos ni zonas de cromatina laxa ^{34,85,228,229,111}.

4. Eritroblasto ortocromático. Sinonimias: normoblasto (Sabin), normoblasto tipo C (Israëls), normoblasto final (Whitby y Britton), normoblasto oxifílico (Undritz), normoblasto ortocromático o acidófilo (Wintrobe). Su diámetro es de 10-15 micras. El protoplasma tiene la tonalidad rosa del hematíe adulto, no guardando restos de la antigua basofilia, el núcleo es considerablemente picnótico ^{34,85,228}.

5. Reticulocito. Sinonimias: pronormocito (Undritz); hematíe con substancia granulofilamentosa (Cesaris-Demel)³⁴. El nombre de reticulocito deriva del aspecto reticulado que muestra en las coloraciones ultravioletales debido a la persistencia en el citoplasma de restos de organelas. Son células de volumen algo mayor que los hematíes adultos, presentes en sangre periférica en una proporción entre 0.5 y 1.5 % de los hematíes ⁸⁵.

Heilmeyer y Westhäuser clasificaron a los reticulocitos en cinco grupos madurativos, basándose en la distribución de la substancia granulofilamentosa a saber: Grupo O, que en realidad es un eritroblasto ortocrómico, cuya substancia granulofilamentosa rodea al núcleo en forma de red tupida; grupo I, con la substancia granulofilamentosa situada en el centro de la célula formando un ovillo denso; grupo II, su retículo es más laxo por haberse extendido a todo el soma del hematíe; grupo III, su substancia granulofilamentosa empieza a disolverse y muestra una distribución irregular, y grupo IV tan sólo le quedan restos de la substancia basófila en la periferia del hematíe, formando gránulos o hebras irregulares. Según Heilmeyer normalmente en la sangre solo contiene los grupos III y IV, siendo los otros privativos de la médula ósea³⁴.

2.2.2. PRECURSORES GRANULOCITICOS

Los hechos evolutivos que involucran estas células son: a) reducción del tamaño y segmentación nuclear progresiva, y b) adquisición de granulación específica (neutrófilica, eosinófilica y basófilica). La secuencia es la siguiente:

1. Mieloblasto. Sinonimias: Hemocitoblasto (Ferrata); linfocito (Pappenheim); hematógono (Mollier)³⁴. Su diámetro es de 14-18 micras. Es una célula de tamaño variable, con alta relación nucleocitoplasmática, nucléolo ocasional y escasa granulación inespecífica, primaria o azurófila (de "azur": púrpura en terminología heráldica; para algunos sin embargo, el mieloblasto carecería de toda granulación, marcando esta la siguiente etapa^{34,85,233} .

2. Promielocito. Sinonimias: progranulocito (Miale); mieloblasto (Ferrata). Esta célula es bastante mayor que el mieloblasto. Se distingue por contener gránulos protoplasmáticos en mayor o menor cantidad. Esta granulación es la denominada inmadura o azurófila, por teñirse de color violeta intenso; tiene bastante tamaño y es muy visible. El núcleo a veces es levemente indentado en el lugar del Golgi ^{34,233}. Hasta esta etapa evolutiva es común para toda la línea granulocítica

3. Mielocito. Célula de menor tamaño, núcleo menor, redondeado, que exhibe por primera vez la granulación específica secundaria. Dependiendo de esta, se pueden distinguir a partir de este momento precursores neutrófilos, eosinófilos, o basófilos. Del cual empezaremos con la morfología de la línea que produce a los neutrófilos que son los siguientes:

El mielocito neutrófilo. Sinonimia: metamielocito neutrófilo (Ferrata). Diámetro. 15-22 micras. El tamaño de la célula aumenta al principio para después ir disminuyendo; el protoplasma a perdido sucesivamente su basofilia, para adquirir en zonas progresivas, la tonalidad acidófila. En el protoplasma existe siempre una mezcla de parte basófila y parte neutrófila, y cosa semejante sucede con la granulación de la que siempre existen de dos tipos, azurófila y neutrófila. El núcleo de forma redondeada, presentan una cromatina algo laxa, y puede presentar o no un nucléolo no siempre evidente ^{34,233}.

4. Metamielocito neutrófilo. Sinonimia: granulocito neutrófilo juvenil. Diámetro de 16-18 micras. Protoplasma completamente adulto

(rosado con granulación fina neutrófila); la basofilia del protoplasma y la granulación azurófila han desaparecido; el núcleo tiene forma redonda más o menos arrañada, la cromatina densa, sin nucléolo ni sus restos ^{34,233}.

5. Granulocito neutrófilo con el núcleo en banda. Sinonimias: neutrófilo de núcleo de bastón, en cayado en insegmentado. Diámetro, 14-16 micras. Este elemento se encuentra en la circulación sanguínea normal, el núcleo tiene forma de cayado sin estar subdividido ^{34,111,233}.

6. Granulocito neutrófilo segmentado o polinuclear. Son los elementos más numerosos en la sangre se presentan en una proporción de 55-65%. Son de tamaño mediano 9-14 micras, contorno redondeado, protoplasma de color rosa muy pálido y con una granulación roja muy pequeña repartida uniformemente y en gran número y por todo el protoplasma. El núcleo forma dos o más lobulaciones, unidas entre sí por un estrangulamiento completo separadas unas de otras y unidas por un hilo fino. El núcleo es de tamaño pequeño, presenta una cromatina densa, con ausencia de nucléolos ^{34,111,233}.

2.2.3. PRECURSORES EOSINOFILOS

Después del promielocito que tiene como tronco común con los neutrófilos, siguen las siguientes etapas:

El mielocito eosinófilo. Diámetro de 16-22 micras. Tiene un protoplasma con una proporción más o menos extensa de basofilia,

granulación mezclada de los dos tipos y presencia o falta de nucléolos, según el grado de madurez, de forma equivalente a la del mielocito neutrófilo ^{34,111}.

Metamielocito eosinófilo. Diámetro de 16-18 micras, protoplasma relleno de granulación eosinófila. Núcleo redondo, carente de nucléolos, con la cromatina bastante densa.

Granulocito eosinófilo de núcleo en banda. Mide al rededor de 16 micras. La forma de este núcleo no es verdaderamente en bastón, pues para segmentarse el granulocito eosinófilo se separa del núcleo en dos proporciones por una estrangulación media. Este núcleo es de cromatina densa .

Granulocito eosinófilo. De tamaño al rededor de 10-15 micras, son de forma redondeada protoplasma claro, cubierto por una granulación gruesa. El núcleo esta en parte borrado por la granulación y es poco segmentado. La cromatina es de estructura densa ^{34,111}.

2.2.4. PRECURSORES BASOFILOS

Al igual que el neutrófilo y eosinófilo, los basófilos parten de un tronco común hasta llegar a la fase de promielocito, y las etapas posteriores a este que llevan a la producción de basófilos son las siguientes:

Mielocito basófilo. Diámetro de 14-16 micras. Esta célula esta en escasa cantidad, siendo difícil de distinguir por confundirse fácilmente la granulación azurófila inmadura con la basofilia, poseyendo características semejantes a las formas de maduración de los neutrófilos ^{34,111}.

Metamielocito basófilo. Diámetro de 14-16 micras. El protoplasma esta lleno de granulación basófila, siendo su núcleo poco visible. Esta célula es casi indistinguible de la forma madura ³⁴.

Granulocito basófilo. Se encuentra raramente, en una proporción de 0-1%, es de tamaño pequeño (8-12 micras). De forma redondeada. Protoplasma de fondo poco visible, pálido azulado o rosado. La granulación es muy característica, de color violeta muy oscuro, el núcleo es poco visible, queda claro con relación a la granulación y es insegmentado o con dos segmentos, que acostumbran a ser de tamaño semejante y forma redondeada ³⁴.

2.2.5. PRECURSORES MONOCITICOS

Constituidos por el monoblasto y el promonocito.

Monoblasto. Esta célula puede confundirse fácilmente con el mieloblasto, de 14-20 micras de diámetro. Su citoplasma es pequeño o moderado, tiene un color ligeramente basófilo, tendiendo a gris, generalmente no granulado aunque puede contener algunos escasos gránulos azurófilos. Su núcleo es de forma redonda u ovalada, con eventual invaginación. Estructura cromática fina, generalmente con uno o dos nucléolos visibles ^{24,85}.

Promonocito. Muy parecido al monocito maduro, de 14-18 micras de diámetro. Con citoplasma azul grisáceo, contiene gránulos azurófilos muy finos de apariencia pulverulenta en cantidad de moderada a abundante. Su núcleo es de forma irregular, generalmente circunvolucionado, con aspecto

de estar doblado. Con estructura cromática más rugosa que en la etapa de monoblasto, eventualmente, presenta un nucléolo.

Monocito. Sinonimias: grandes mononucleares y formas de transición. Su diámetro es de 14-20 micras. Con citoplasma abundante de color azul grisáceo, con numerosos gránulos finos azurófilos, que le dan el aspecto de cristal de rosa, y pueden existir vacuolas. Su núcleo es de forma redonda o arriñonada o ligeramente lobulada. Puede estar doblado sobre si mismo dando un aspecto de circunvoluciones cerebrales. La cromatina es fina, uniforme y transparente, hay ausencia aparente de nucléolos ^{24,34,85}.

2.2.6. MEGACARIOCITOS O PRECURSORES PLAQUETARIOS

Los megariocitos son células verdaderamente grandes, con un gran núcleo que se tiñe de oscuro, compuesto por una serie de lóbulos interconectados. Esta morfología nuclear es consecuencia de la poliploidía; la mayoría de los megacariocitos tienen ocho veces más el número diploide de cromosomas. Además de tener un enorme núcleo posee una gran cantidad de citoplasma ^{85,233}.

La función de estas células es producir plaquetas sanguíneas, las cuales son fragmentos liberados del citoplasma que circulan en la sangre periférica.

El megacarioblasto. Es difícilmente diferenciable de un mieloblasto o un proeritroblasto aunque su tamaño es superior (20-50 micras de diámetro). Con citoplasma moderado a abundante, basófilo con diferentes tonalidades de azul, generalmente es más oscuro que el mieloblasto, y

puede presentar pequeños pseudópodos atrofiados, presenta en general una banda estrecha alrededor del núcleo y a medida que la célula evoluciona, disminuye la cantidad de citoplasma siendo este generalmente no granulado. Su núcleo es generalmente redondo, ovalado o arriñonado. Su estructura cromática fina, con abundantes nucléolos coloreados en azul
34,85,233

Promegacariocito. De 20-50 micras de diámetro, citoplasma generalmente abundante, menos basófilo que en la etapa de blasto, e inicia la formación de gránulos. Con núcleo gigante, esbozando una lobulación. Su cromatina se vuelve más rugosa, presenta muchos nucléolos visibles^{24,85}.

Megacariocítico formador de plaquetas. Es una célula de gran citoplasma (la mayor célula de la médula ósea) su dimensión es de 30-100 micras, con citoplasma abundante, de color azul rosáceo, muy granulado. A ultraestructura, estas células muestran las típicas membranas de demarcación, y pueden verse sus bordes desflecados liberando algunas plaquetas; el núcleo poliploide y lobulado. Su cromatina es más rugosa que en la etapa anterior. Hay ausencia aparente de nucléolos^{24,85}.

Plaqueta. Sinonimia: trombocito, hematoblasto. De diámetro de 1-4 micras. Su citoplasma es de color azul claro o púrpura, muy granulado. Comprende dos partes: 1) el cromómero, granulado y situado en la parte central, y 2) el hialómero que rodea al cromómero de color azul claro y no granulado. Con núcleo ausente^{24,85}.

En la figura 2.5 se muestra las etapas de maduración de las diferentes líneas celulares descritas.

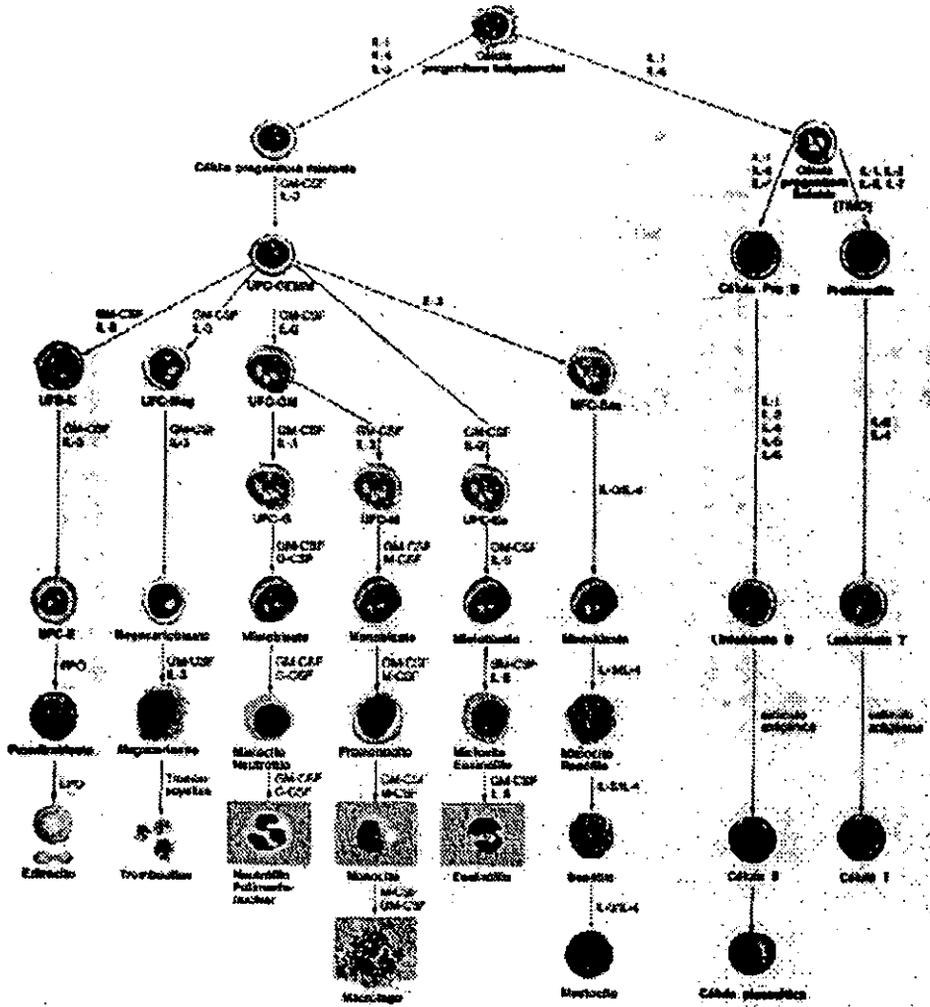


fig. 2.5. Esquema de diferenciación celular hematopoyética. (189)

CAPITULO 3

REGULADORES DE LA PRODUCCION HEMATOPOYETICA

En los organismos superiores, existen diferentes mecanismos que promueven la comunicación intercelular dado que las células no viven o funcionan en forma aislada. Tal comunicación es necesaria para regular su desarrollo y organización, para controlar su crecimiento y su división, así como para coordinar la mayoría de sus diversas actividades.

Una forma de comunicación celular es por medio de mediadores químicos y se efectúa por la unión de éstos a proteínas específicas de las células conocidas hoy en día como receptores⁵⁵.

En el sistema hematopoyético, se han caracterizado diferentes mediadores químicos denominados citocinas, los cuales participan en diversos mecanismos que permiten sostener un steady-state de las diferentes líneas celulares mieloide y linfoides.

3.1. FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS (CSF) E INTERLEUCINAS (ILs)

El término citocina fué introducido en 1974 por S. Cohen para describir sustancias solubles producidas por células que ejercen un efecto específico sobre otras "células blanco" estas citocinas han mostrado su bioactividad a través de diferentes ensayos²²⁴.

Las citocinas son polipéptidos simples o glicoproteínas solubles de peso molecular entre 10 y 35 Kd, las cuales participan en un gran número de funciones celulares, actuando a concentraciones muy bajas del orden de << picomolar >> (10^{-12} molar)⁸⁶. Algunas de ellas como la eritropoyetina y los factores estimulante de colonias hematopoyéticas, bloquean el proceso de apoptosis (muerte celular programada), mientras que otras , como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el interferón (IFN) lo promueven. También hay citocinas que estimulan la proliferación celular, partiendo de las células madre para su autopropagación y diferenciación así como en la maduración de una línea celular específica.

Las citocinas son producidas por una gran variedad de células, incluyendo a los linfocitos, monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, osteoblastos, adipocitos, células del riñón, hígado así como diversas líneas tumorales.

La característica más fascinante de las citocinas es su <<pleiotropismo >>. Todas ellas tienen más de una función y ésta dependerá de distintos aspectos, incluyendo : sobre qué célula actúan (prácticamente todas las citocinas descritas hasta ahora, tienen más de una sola célula blanco), la concentración a la que actúan y la presencia de otras citocinas, las cuales pudieran potenciar o inhibir su acción ¹²³.

Para la función de las citocinas se requiere de la participación de cinco componentes 1) las células que las producen, 2) la citocina producida, 3) la presencia del receptor celular específico, 4) la célula

objetivo, y 5) que la célula disponga de los sistemas bioquímicos a través de los cuales se realiza la transducción de la señal generada por la unión de ligandos²⁸.

Las citocinas producen una red de comunicación intercelular. En cuanto a su función las citocinas se conocen como factores de crecimiento (CF), factores estimulantes de colonias (CSF), interleucinas (ILs), interferones (IFN) y factor de necrosis tumoral (TNF)²²⁴.

Las citocinas son fundamentales en la regulación de la hematopoyesis ya que se encuentran involucradas en la sobrevivencia, proliferación y diferenciación, de las células progenitoras hematopoyéticas¹⁴⁶. Además, son requeridas para el mantenimiento de la maduración del fenotipo y para activación de las funciones de las células maduras^{131,236}.

Estudios recientes han documentado la función de una variedad de CSF e interleucinas los cuales muchos de éstos factores fueron primeramente caracterizados por su actividad biológica producida en líneas celulares cultivadas, incluyendo: fibroblastos, linfocitos T, y varias células tumorales. En muchos casos particularmente en líneas de células T, la producción de factores de crecimiento hematopoyético es estrictamente regulada y producida sólo cuando éstas células son activadas. Los CSF por tanto son subdivididos de acuerdo al mayor tipo de células maduras que ellos inducen. Por ejemplo, M-CSF y G-CSF son inductores de macrófagos y granulocitos respectivamente^{131,236}.

Otro grupo de citocinas que no presentan la propiedad de inducir la formación de colonias en agar, pero que afectan algunas actividades biológicas de las células mieloides, y que son producidas por leucocitos, fueron llamadas interleucinas (IL-1 a la IL-12) que a su vez actúan en procesos del sistema inmune, junto con los interferones y TNF ^{28,127}.

Las principales funciones de las interleucinas son: 1) promover la inmunidad natural como resultado de la infección de macrófagos por agentes microbianos, 2) regular la activación, el crecimiento y diferenciación de los linfocitos como consecuencia del reconocimiento del antígeno por las células T, 3) la activación de las células inflamatorias en respuesta a reconocimiento antigénico, y 4) la estimulación y diferenciación de los leucocitos por citocinas secretadas por linfocitos y otros tipos celulares ^{28,160}.

Los factores estimulantes de crecimiento hematopoyético e interleucinas que han sido purificados y caracterizados; han permitido abrir un panorama del control humoral de la hematopoyesis; en la actualidad se han descrito casi una veintena de factores humorales con la capacidad de estimular tanto la proliferación como la diferenciación hematopoyética, de los cuales sus principales funciones se resumen en la tabla 3.1 y 3.2

Muchas citocinas operan predominantemente en forma <<autócrina>> (es decir, actúa sobre la misma célula que la produce), <<parácrina>>(de forma localizada o no-circulante), o <<endócrina>>

(como hormonas convencionales)^{86,225}. Por lo tanto, sus efectos son sujetos a alteraciones en el microambiente en el cual son secretados.

TABLA 3.1. FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS MIELOIDES^{132,201,228}

NOMBRE O SINÓNIMOS	LOCALIZACIÓN DEL GEN Y ORIGEN CELULAR	EFFECTOS BIOLÓGICOS
FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS GRANULOCÍTICAS. CSF (lg1-2) SF-β	CROMOSOMA 17 MACRÓFAGOS CÉLULAS ENDOTELIALES FIBROBLASTOS	<ul style="list-style-type: none"> • ESTIMULA LA FORMACIÓN DE COLONIAS GRANULOCÍTICA IN VITRO. • ACTUA CON LA IL-3, CSF-GM Y CSF-M PARA ESTIMULAR LA FORMACIÓN DE MEGACARIOCITOS, GRANULOCITOS Y MONOCITOS. • ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN Y MADURACIÓN DE CÉLULAS MALIGNAS. • ESTIMULA IN VIVO LA PRODUCCIÓN DE NEUTRÓFILOS.
FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS GRANULOCITOS/MACROFAGOS. CSF (M-CSF) (SF-α)	CROMOSOMA 5 LINFOCITOS T CÉLULAS ENDOTELIALES FIBROBLASTOS	<ul style="list-style-type: none"> • ESTIMULACIÓN DE COLONIAS GRANULOCÍTICAS-MONOCÍTICAS IN VITRO. • ACTÚA SINERGÍSTICAMENTE CON OTROS FACTORES PARA ESTIMULAR LOS MEGACARIOCITOS CÉLULAS BLASTOIDEAS Y COLONIAS BFU-E IN VITRO. • ACTIVACIÓN FAGOCÍTICA Y CITOTÓXICA EN LOS NEUTRÓFILOS MADUROS. • INCREMENTA LA ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS MADURAS EN LOS NEUTRÓFILOS. • INHIBE LA MOVILIDAD DE LOS NEUTRÓFILOS MADUROS.
FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS-1.	CROMOSOMA 5 MACRÓFAGOS	<ul style="list-style-type: none"> • ESTIMULA LA FORMACIÓN DE COLONIAS DE MACRÓFAGOS IN VITRO.

NOMBRE O SINÓNIMOS	LOCALIZACIÓN DEL GEN Y ORIGEN CELULAR	EFECTOS BIOLÓGICOS
SF-1) L-CSF)	CÉLULAS ENDOTELIALES FIBROBLASTOS	<ul style="list-style-type: none"> • ACTUA SINERGÍSTICAMENTE CON OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA FORMACIÓN DE COLONIAS IN VITRO. • MANTIENE LA SUPERVIVENCIA DE MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS IN VITRO. • INDUCE LA FAGOCITOSIS Y FUNCIÓN SECRETORA EN MONOCITOS Y MACRÓFAGOS.
ACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE MULTILINEAS. (Multi-CSF) L-3) (AF)	CROMOSOMA 5 LINFOCITOS T	<ul style="list-style-type: none"> • ESTIMULA LA FORMACIÓN DE CFU-GEMM IN VITRO. • ACTUA CON LA EPO PARA ESTIMULAR LA FORMACIÓN DE COLONIAS DE BFU-E Y CON CSF PARA ESTIMULAR A CÉLULAS HPP. • INDUCE CFU-S Y BLASTOS LEUCÉMICOS DENTRO DEL CICLO CELULAR.
ERITROPOYETINA (EPO).	CROMOSOMA 7 CÉLULAS INTERSTICIALES RENALES.	<ul style="list-style-type: none"> • ESTIMULA LA FORMACIÓN DE COLONIAS ERITROIDES (CFU-E) IN VITRO. • ACTÚA SINERGÍSTICAMENTE CON IL-3 PARA ESTIMULAR LA FORMACIÓN DE BFU-E IN VITRO. • ESTIMULA LA ERITROPOYESIS IN VIVO EN ANIMALES Y HUMANOS. • CONTROLA EL FEEDBACK DE LA ERITROPOYESIS.
ACTOR STEEL (ACTOR STEM CELL) (C-Kit)	CROMOSOMA 12 UBICUO	<ul style="list-style-type: none"> • FAVORECE EL CRECIMIENTO CLONAL DE CFU-GEMM, BFU-E, Y CÉLULAS PRE-B, CUANDO SE COMBINA CON FACTORES DE CRECIMIENTO COMO IL-3, EPO, O IL-7 ACTÚAN DIRECTAMENTE; INCREMENTA EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS MAST.
ACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIAS	CROMOSOMA 22 MONOCITOS	<ul style="list-style-type: none"> • ESTIMULA LA RESORCIÓN DEL HUESO FAVORECIENDO EL CRECIMIENTO DE MEGACARIOCITOS

NOMBRE O SINÓNIMOS	LOCALIZACIÓN DEL GEN Y ORIGEN CELULAR	EFECTOS BIOLÓGICOS
(LIF)	MONONUCLEARES CÉLULAS ESTROMALES	<p>IN VIVO Y AUMENTANDO LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS HUMANAS MULTIPOTENTES.</p> <ul style="list-style-type: none"> • INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS MURINAS Y HUMANAS E INHIBE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE CARCINOMA EMBRIONARIO.
<p>FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-α TNF-α</p>	<p>CROMOSOMA 6 MACRÓFAGOS CÉLULAS B CÉLULAS NK</p>	<ul style="list-style-type: none"> • INDUCE LA EXPRESIÓN DE GM-CSF, G-CSF, IL-6 E IL-1 EN FIBROBLASTOS Y CÉLULAS ENDOTELIALES; INDUCE LA LIBERACIÓN DE GM-CSF Y M-CSF IN VIVO, E INHIBE DE LA REPLICACIÓN DE CIERTOS VIRUS SINERGÍSTICAMENTE CON INTERFERONES; ESTIMULA LA PRODUCCIÓN DE PROSTANGLANDINA E EN FIBROBLASTOS Y NEUTRÓFILOS. • INHIBE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS, LINFOCITOS Y CIERTAS LÍNEAS DE CÉLULAS LEUCÉMICAS. • AUMENTA LA CITOTÓXICIDAD DE EOSINÓFILOS Y MACRÓFAGOS EN PARÁSITOS Y CÉLULAS TUMORALES.

TABLA 3.2. INTERLEUCINAS QUE INTERACTUAN DURANTE LA HEMATOPOYESIS. ^{132,201,228}

INTERLEUCINA (IL)	LOCALIZACIÓN DEL GEN Y ORIGEN CELULAR	EFECTO BIOLÓGICO
IL-1	<p>CROMOSOMA 2 MONOCITOS MACRÓFAGOS CÉLULAS ENDOTELIALES QUERATINOCITOS.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • AUMENTA LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T Y SÍNTESIS DE IL-2. • FACTOR DE CRECIMIENTO HEMATOPOYÉTICO TEMPRANO YA QUE SINERGIZA CON IL-3 ESTIMULANDO LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS PRIMITIVAS. • INDUCE LA EXPRESIÓN DE GM-CSF, G-CSF, IL-6 E IL-1 EN CÉLULAS

INTERLEUCINA (IL)	LOCALIZACIÓN DEL GEN Y ORIGEN CELULAR	EFECTO BIOLÓGICO
		ESTROMALES. • SÍNTESIS DE FIBROBLASTOS.
IL-2	CROMOSOMA 4 ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T	• ES EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS T Y B Y DE NK. • INDUCE LA EXPRESIÓN DE IL-1 EN MONOCITOS Y MACRÓFAGOS. • INCREMENTA LA CITOTÓXICIDAD DE CÉLULAS T.
IL-3	CROMOSOMA 5 ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T Y B.	• FACTOR DE CRECIMIENTO MULTIPOTENCIAL HEMATOPOYÉTICO.
IL-4	CROMOSOMA 5 ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T Y ALGUNAS CÉLULAS MALIGNAS.	• FACTOR DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS MASTOIDEAS. • FACTOR DE ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T Y B.
IL-5	CROMOSOMA 5 CÉLULAS T	• INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS T, B Y LOS EOSINÓFILOS.
IL-6	CROMOSOMA 7 MONOCITOS FIBROBLASTOS	• INDUCE AL FACTOR DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS B. • SINERGIZA CON IL-3 EN LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CFU-GEMM, CON M-CSF, Y CON GM-CSF. • SINERGIZA CON IL-4 INDUCIENDO CÉLULAS T, Y CÉLULAS PROGENITORAS MULTIPOTENCIALES.
IL-7	CROMOSOMA 8 CÉLULAS ESTROMALES	• COESTIMULA CÉLULAS T, • INDUCE LA SECRECIÓN DE CITOCINAS POR MONOCITOS Y MACRÓFAGOS. • INDUCE EL CRECIMIENTO CLONAL DE CÉLULAS PRE-B
IL-8	CROMOSOMA 4 CÉLULAS ESTROMALES MACRÓFAGOS CÉLULAS T	• INDUCE LA QUIMIOTÁXIS DE NEUTRÓFILOS.

INTERLEUCINA (IL)	LOCALIZACIÓN DEL GEN Y ORIGEN CELULAR	EFECTO BIOLÓGICO
L-10	CROMOSOMA 1 CÉLULAS T MACRÓFAGOS	<ul style="list-style-type: none"> • INDUCE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS B Y CÉLULAS MAST. • INHIBE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS POR MONOCITOS. • INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T Y LA PRODUCCIÓN DE IL-2 E INHIBE A IL-5 POR SECRECIÓN DE ANTICUERPOS. • SINERGIZA CON TGF-β E IL-4 PARA INHIBIR LA CITOTOXICIDAD DE MACRÓFAGOS.
IL-11	HÍGADO O RIÑÓN	<ul style="list-style-type: none"> • CÉLULAS T, B, CFU-GEMM, MACRÓFAGOS.

3.1.1. RECEPTORES:

Los factores de crecimiento hematopoyético como mediadores químicos, requieren de receptores de superficie en células blanco para expresar su actividad. Algunos de los receptores para estas sustancias pueden existir en dos formas moleculares: una integrada a la membrana celular, y otra en forma soluble y circulante, actuando, quizás, como mecanismo regulador de la concentración de sustancia activa ^{73,86}.

Cualquiera que sea su forma de presentación, todas las citocinas actúan en las células hematopoyéticas a través de la interacción directa con receptores específicos ubicados en la superficie celular. Dichos receptores son proteínas transmembranales con un dominio extracelular (que interacciona con la citocina o ligando), una porción que atraviesa la bicapa lipídica y, un dominio citoplasmático. Este

último está involucrado en la transducción de señales, las cuales se inician en el momento de la interacción entre el receptor y su ligando. Posteriormente dichas señales, pasan por una cascada de intermediarios moleculares (proteínas citoplásmicas) a través de mecanismos de fosforilación y defosforilación. Finalmente, las señales llegan al interior del núcleo celular, donde interaccionan con factores de transcripción, los cuales se encargan de encender y/o apagar la expresión de genes específicos. Es importante mencionar que algunos de los receptores de citocinas (como los receptores de M-CSF, EPO y factor Steel), algunas de las proteínas citoplásmicas involucradas en la transducción de señales (como Ras y Src), así como algunos factores de transcripción (como Myc, Fos y Jun) son proto-oncogenes, es decir, genes involucrados en la proliferación y/o diferenciación celular, los cuales al ser alterados en su secuencia nucleotídica, localización cromosómica número de copias en el genoma, pueden causar la transformación neoplásica de células hematopoyéticas ^{122,169}.

Se han descrito diferentes clases de receptores de superficie. Una primera clase de receptores carente de actividad de tirocina-cinasa y que tiene características estructurales representadas en el dominio extracelular. Una segunda familia de receptores que posee actividad de tirosina-cinasa en el dominio citoplasmático. Y por último se incluye a una familia de receptores similares a la superfamilia de las inmunoglobulinas ^{73,201}. Los estudios estructurales de los receptores de los CSF, se inician con los trabajos realizados por Sherr en 1985, en los cuales se demuestra que el proto-oncogen c-fms es expresado en

células de la estirpe monocito-macrófago, y que comparte una estrecha homología con su contraparte oncogénica, el v-fms, que posee una actividad tirocina-cinasa. De esta manera, se describe por primera vez al receptor para el M-CSF, el cual comparte características estructurales con el receptor para el PDGF(factor de crecimiento derivado de plaquetas) y el receptor para c-kit, cuyo ligando es el factor de células progenitoras pluripotentes (SCF por sus siglas en inglés stem cell factor).

Los receptores para G-CSF, GM-CSF e IL-3 presentan una estructura diferente a las del receptor para M-CSF, Estos se distinguen por poseer una región N-terminal bastante conservada de aproximadamente 210 aminoácidos (aa) de extensión en la cual predominan dos juegos de cisteínas, formando un asa en el sitio receptor de la hormona de crecimiento, así como una secuencia conservada triptofano-serina-X-triptófano-serina cerca de la parte intramembranal. Aunque el dominio extracelular está altamente conservado en estos receptores, no ocurre así con el dominio intracitoplasmático, el cual varía en su extensión desde los muy cortos (54aa para el receptor del G-CSF) hasta los muy extensos (568 aa para el receptor de IL-4). Esta nueva familia de receptores de las citocinas, incluye a los receptores de las IL-2 (cadenas β), 3,4,5,6,y 7, la eritropoyetina, la hormona de crecimiento, la prolactina, y el proto-oncogen recientemente descrito c-mpl.

Inicialmente, estudios experimentales de entrecruzamiento químico demostraron que los receptores de los CSFs eran de alta afinidad ($K_{da} = 10-100 \text{ pM}$). Sin embargo, recientemente ha sido demostrado que estas células también expresan receptores de baja afinidad ($K_{da} = 1-10 \text{ nM}$). Inclusive, se han dado evidencias de que la tasa de disociación para ambos receptores es la misma, existiendo una heterogeneidad en la expresión de éstos sobre las células mieloides^{127,201}.

De particular interés, es la interconvertibilidad observada en estos receptores, provocando que los receptores, de baja afinidad puedan unirse a una subunidad intramembranal, transformándose en receptores de alta afinidad. Actualmente, han sido clonados los receptores de alta afinidad para los factores IL-2, IL-3, IL-5, IL-6 y GM-CSF, los cuales están compuestos de dos subunidades: α y β , la primera encargada de la unión del ligando y la segunda posiblemente involucrada en la transducción de la señal biológica¹²⁷.

La elevada homología observada en la parte N-terminal de estos receptores ha sido postulada como una posible explicación parcial del traslapamiento en la actividad biológica observada en algunos factores. Los resultados obtenidos en la clonación de los receptores de esta superfamilia han confirmado en parte este supuesto; ahora se sabe que los receptores para GM-CSF, IL-3, e IL-5 poseen la misma subunidad β por lo cual puede ocurrir un entrecruzamiento a nivel del receptor^{127,201}.

Las interleucinas también interactúan con receptores de membrana específicos, sobre sus células "diana". Se tiene por ejemplo, dos formas estructuralmente distintas de IL-1 (IL-1 α , e IL-1- β), que muestran las mismas propiedades biológicas y se enlazan al mismo receptor. Experimentos de entrecruzamiento identifican al receptor de IL-1 como una glicoproteína de 80 KDa, la cual se expresa en una variedad de tipos celulares. y es reconocida por ambas formas estructurales. Además de este receptor, es probable que exista otro pero con una menor afinidad. El DNA complementado (DNAC) para el receptor de IL-1 en el ratón ha sido molecularmente clonado, y el número de receptores (sitios/célula) es de aproximadamente de 0 a 30,000.

Gracias al desarrollo de la ingeniería genética en la clonación de ILs y CSFs; además, del desarrollo de la biología molecular; ha sido posible caracterizar los receptores para IL-4, IL-2, IL-5, IL-6, etc. conociendo sus propiedades fisico-químicas, estructura molecular, tipos de enlace (afinidad, kD constante de disociación), su sitio(s) de expresión, y aún más ha sido posible clonar algunos receptores de ILs: (IL-6, IL-2 (de la línea de células Nk humanas), IL-4 (ratón), etc.).

Los receptores de las citocinas pueden ser agrupados dentro de un número de familia de acuerdo a las homologías estructurales, así por ejemplo, las ILs 3,4,5,6 y la cadena β de IL-2 pertenecen a la superfamilia de receptores para citocinas. En cambio, que el receptor para IL-1 no pertenece a la gran superfamilia, sino a la superfamilia de las inmunoglobulinas ^{127,201}.

3.1.2. FACTORES DE CRECIMIENTO QUE ACTUAN SOBRE UNA LINEA ESPECIFICA.

Factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF)

El G-CSF se definió primeramente como un factor el cual tiene la capacidad tanto de estimular colonias de granulocitos normales y la de inducir la maduración de líneas celulares leucémicas. Este ha sido purificado del pulmón de ratón y tiene un peso molecular de 25,000 daltons. El G-CSF humano tiene un peso molecular similar y reacción cruzada con ambas células murina y humana. El DNAc (DNA complementario) se ha clonado en ambos. El DNA humano codifica un polipéptido de 30 aminoácidos. Estas proteínas estimulan primordialmente la producción de colonias granulocíticas; el G-CSF actúa sinérgicamente con la IL-3 para desarrollar colonias blásticas in vitro; y así mismo juntos estimulan la formación de colonias megacariocíticas. El G-CSF también afecta a progenies diferenciadas. Los receptores de G-CSF se han encontrado en neutrófilos humanos y en líneas celulares leucémicas y líneas de células promonocíticas. El receptor de G-CSF ha sido clonado y caracterizado como un miembro de la superfamilia de los receptores de citocina.

El G-CSF también estimula la proliferación y aumenta la diferenciación de progenitores blásticos de leucemia mielógena; no obstante el efecto de G-CSF sobre células maduras es limitado a los neutrófilos, y no hay un aparente efecto sobre eosinófilos o monocitos⁶¹. EL G-CSF es activo in vivo en primates, hamsters, y humanos. En la tabla 2 se resume su bioactividad.

Cuando se administra a humanos éste induce a leucocitosis neutrofilica. Además se ha observado que ejerce un grado de estimulación sinérgica en células progenitoras multilineales, la mayor parte de la actividad cuantificable es realmente específica para la línea neutrofilica ^{41,73,127,201}.

Factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF)

El factor estimulante de monocitos (M-CSF) o CSF-1 es un factor de crecimiento mononuclear fagocítico, que se ha purificado tanto de fuentes humanas (orina), como murinas (células L)⁶¹. El CSF-1 urinario es un pesado hemodímero glicosilado con una masa molecular de 45,000 daltons mientras que el material purificado de células L de medios de cultivo condicionados es una glicoproteína de 70,000 daltons ²²⁸. Los genes de ambos CSF-1 han sido clonados y expresados in vitro. El gen humano de M-CSF es un único gen que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 5 humano ^{61,132,137,228}.

El CSF-1 actúa sobre la población de células progenitoras con una alta predilección por macrófagos maduros, aunque en el período de cultivo puede dar alguna producción de granulocitos ¹⁹⁰. El CSF-1 se adhiere a macrófagos maduros y es internalizado y degradado.

Altos niveles de CSF- 1 estimula la síntesis de proteínas, la división celular y varias funciones de los macrófagos incluyendo actividad anti-tumor, secreción de productos de reducción de oxígeno, y es un activador del plasminógeno. El CSF-1 también induce la producción de (IL-1), de macrófagos. Los productos de c-fms proto-

oncogen es el receptor de CSF-1 y está presente en el brazo largo del cromosoma 5 ^{61,201,228}. El receptor es una tirosin cinasa la cual se autofosforila; el número de receptores se incrementa con la diferenciación y pueden ser inducidos por otros factores de crecimiento.

Eritropoyetina (EPO)

La EPO es una glucoproteína de bajo peso molecular de 34,000 daltons⁶. Los primeros estudios realizados a la eritropoyetina fueron hechos por Carnot y Deflandre en 1906, los cuales inyectaron suero de un conejo anémico a un conejo normal, y observaron posteriormente que hubo un aumento en los niveles de los eritrocitos, lo cual hizo suponer que el animal anémico contenía una sustancia (hemopoyetina) que aumentaba la eritropoyesis. Posteriormente en 1948, Bonsdorff y Jalavisto centraron su atención en la actividad estimuladora de la eritropoyesis del factor humoral, al que llamaron eritropoyetina ^{129,148}.

La eritropoyetina se expresa suficientemente por células hepáticas en el feto, y específicamente en los riñones en la vida adulta ²⁰¹. La EPO principalmente se produce en riñón, y quizá su formación está a cargo de las células del glomérulo, ya que, hasta ahora no se ha definido bien el sitio exacto y tipo de células que producen ésta hormona.

También se ha considerado al hígado productor principal de EPO en murinos y en mamíferos (carnero). La inducción de EPO es debida a la reducción de oxigenación tisular principalmente ^{6,13,129,233}.

La eritropoyetina estimula el crecimiento y diferenciación de células progenitoras eritroides BFU-E y CFU-E, estimula la proliferación y síntesis de RNA en células progenitoras eritroides reconocibles morfológicamente. Así mismo, se ha reportado que la EPO estimula a varios niveles de megacariocitopoyesis in vitro y producción plaquetaria en animales de experimentación, aunque en realidad se desconoce su importancia fisiológica. Sin embargo, in vivo aparentemente no tiene una actividad trombocitopoyética. La EPO recombinante humana, no ha mostrado efectos consistentes en el conteo plaquetario²⁰¹. La EPO recombinante ha mostrado su efecto en el manejo de la anemia asociada a falla renal, así como, en infantes con deficiencias nutricionales extremas, previniendo o corrigiendo en parte la hematopoyesis inadecuada²²². Los receptores de EPO parecen estar mayormente expresados por células comisionadas para eritropoyesis, aunque también el receptor esta expresado en cierto grado en células madre embrionarias y células endoteliales y en líneas celulares que responden a IL-3 que carecen de característica eritroide (pero pueden tener potencial eritroide), así como en megacariocitos de roedores. Los receptores de murino y humanos han sido clonados y caracterizados²⁰¹. Los receptores de EPO pertenecen a la superfamilia de receptores de factores de crecimiento carentes de una tirosin cinasa u otro campo catalítico, por consiguiente éstos receptores requieren del auxilio de un cofactor proteínico relacionado a la membrana integral para formar un receptor altamente funcional. En unión a EPO los receptores traducen señales que resultan en un nivel temprano de calcio intracelular libre y fosforilación proteínica citosólica. La activación

del proto-oncogel raf-1 es inducida por EPO; la cual es necesaria para la transducción de señales a través de una variedad de receptores de factores de crecimiento hematopoyético, y de esta manera actúa como un mediador esencial de la respuesta final de EPO²⁰¹.

Interleucina-5

La interleucina-5 (IL-5) es un factor producido por linfocitos T, coinduce la secreción de inmunoglobulina, estimula la producción y diferenciación de eosinófilos selectivamente tanto in vitro como in vivo^{35,69,201}. Así mismo induce la diferenciación de linfocitos T y B⁶.

El gen de IL-5 conjuntamente con IL-4, IL-3, GM-CSF, y proto-oncogel c-fms (los receptores para M-CSF), están localizados en el brazo largo del cromosoma 5.

El receptor para IL-5 se encuentra expresado principalmente en células B y eosinófilos con formas de alta y baja afinidad¹²⁷. Las formas solubles del receptor de la IL-5 han sido clonadas y caracterizadas y comparten una subunidad común β con los receptores GM-CSF e IL-3, lo cual hace que haya un fenómeno de competencia cruzada entre GM-CSF, IL-5 e IL-3 por receptores de superficie sobre el tipo de células seleccionadas²⁰¹.

Interleucina-7

La actividad biológica de los 17 kDa de la molécula de IL-7 esta sobre células linfoides. También se ha reportado que induce la secreción de citocinas por monocitos de sangre periférica, pero este

efecto puede ser mediado por otros factores inducidos por IL- 7 en células linfoides. El gen humano de la IL-7 produce enlaces a una molécula receptora, un miembro de la superfamilia de receptores de citocína y estimula el cambio de fosfoinosítide y fosforilación de tirosina²⁰¹.

Interleucina-2

La bioactividad de IL-2 se observa en la tabla 3.2; es una proteína de 24 Kdaltons es producida mayormente por células linfoides en crecimiento y diferenciación, aunque también induce la expresión de IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en fagocitos mononucleares. También se ha encontrado que la IL-2 está involucrada en una etapa limitada de la mielopoyesis temprana, cuando las células comienzan a diferenciarse hacia la serie monocítica. Promueve la proliferación de precursores macrófagos en el ratón, de blastos de pacientes con leucemia mieloide aguda, principalmente en los tipos M4 (leucemia mielomonocítica) y M5 (leucemia monocítica) correspondientes a la clasificación de la FAB (Franco-Americana-Británica), y de células leucémicas de ratón (WEHI3BD-)¹²⁷.

La IL-2 se une a un receptor heterodimérico con subunidades de 75 y 55 Kda , expresados por linfocitos T, células Natural Killer (NK) , células B, macrófagos y polimorfonucleares (PM) y traduce señales una mínima parte a través de la activación de la tirosina específica y cinasa dependiente de calmodulina

antígeno aumenta su proliferación y diferenciación e interactúa con células citotóxicas ¹²⁷.

Los receptores de IL-2, cadenas α - y β - han sido clonados y cada uno muestra enlaces de baja afinidad con IL-2. Sin embargo, la co-expresión de ambas cadenas lleva a la formación de receptores de alta-afinidad a IL-2. La señalización se piensa que ocurre a través de las cadenas β ^{19,127}.

3.1.3. FACTORES MULTILINAGE.

Interleucina-3

La Interleucina-3, (multilínage-CSF); (ver tabla 3.2) es un factor producido por activación de linfocitos T y células NK. Estimula células hematopoyéticas de todas las estirpes por lo que también ha sido llamada hemopoyetina panespecífica⁶⁹. Su mayor actividad in vitro de la IL-3 humana es el mantenimiento del desarrollo de colonias mixtas (CFU-Mix) mieloides/eritroides, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y células mast. A bajas concentraciones es capaz de estimular la proliferación y la diferenciación de las células de la estirpe macrófago-granulocito; sin embargo, si se utiliza a concentraciones más elevadas favorece el crecimiento de progenitores de eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y basófilos. IL-3 estimula la función de los macrófagos y la función de los eosinófilos maduros, causa liberación de histamina de basófilos ^{61,73}

Así mismo, la IL-3 interactúa con eritropoyetina para estimular la célula madre eritroide primitiva y con CSF-1 para estimular la proliferación de células formadoras de colonias de potencial altamente proliferativo (HPP-CFC), y al parecer soportar la formación de células blásticas multilíneas primitivas *in vitro*, así como favorece el crecimiento de células leucémicas de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA). No obstante, el amplio espectro de actividades biológicas observadas *in vitro* no se correlacionan con las observadas *in vivo*. El análisis de los recuentos leucocitarios en paciente con LMA, a los que se les ha inoculado IL-3 recombinante humana, muestra que los principales incrementos se dan en la serie macrofágica y granulocítica, sin afectar a otros progenitores mieloides. Aún no queda claro si este efecto es debido a la concentración administrada o a la forma de su inoculación ¹²⁷.

Es idéntico al "factor activador de células madre" el cual induce a CFU-S en el ciclo celular ^{164,228}.

Los efectos biológicos de IL-3 se efectúa a través de receptores específicos de alta afinidad, compuestos de una subunidad α de 378 aminoácidos (IL-3R α) y una subunidad β común a los receptores de alta afinidad para IL-3, GM-CSF y IL-5; los cuales se encuentran en fagocitos mononucleares maduros, eosinófilos, células mast y basófilos ^{61,167}. La IL-3 puede traducir señales de éstos receptores a través de proteínas G en la vía inositol-fosfato vía segundo mensajero ²²⁸.

La IL-3 y GM-CSF ambos tienen receptores de alta afinidad en la superficie de eosinófilos humanos y éstas uniones son mutuamente inhibidas pero no por otras citocinas. El mecanismo preciso de ésta inhibición recíproca aún no se conoce^{61,127}.

La administración de IL-3 a monos induce el incremento de dos a tres veces el total de células blanco incluyendo aumentos en neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Estudios en humanos han mostrado una toxicidad relativamente baja⁶¹.

Factor estimulante de colonias granulocito-macrofago (GM-CSF)

El GM-CSF humano fue purificado de una línea humana de células T leucémicas^{61,228}. La hormona humana purificada es una glicoproteína con un peso molecular de 22,000 daltons. El GM-CSF primeramente se había aislado de pulmones murinos siendo su peso molecular de 23,000 daltons. El DNAC codifica la proteína GM-CSF humano fue molecularmente clonado por Wong y colaboradores y subsecuentemente por otros, a partir de RNA obtenido de líneas de células-T. El DNAC para GM-CSF humano contiene 432 nucleótidos que codifican a 144 aminoácidos. La proteína madura tiene 127 residuos de aminoácidos.

El GM-CSF humano en un 60 % de aminoácidos es homólogo al GM-CSF murino; pero no hay reactividad cruzada entre ambos GM-CSFs, ya que el de origen humano no tiene actividad en la médula ósea del murino. El gen humano que codifica para GM-CSF se localiza en el cromosoma 5 con una región de control encontrada en el gen 5',

el mismo sitio en donde se codifican otras hormonas hematopoyéticas y sus receptores; mientras que el de murino está localizado en el cromosoma 11^{61,228}.

El GM-CSFr biosintético (recombinante) humano, es producido usando vectores de expresión apropiados en células de mamíferos, y bacterias. El GM-CSFr es una proteína glucosilada producida por una cepa de *Escherichia coli* con las mismas características físicas y biológicas que el GM-CSF natural (endógeno)^{61,189}. El GM-CSF es un mensajero intercelular que ejerce su acción uniéndose a receptores específicos en las membranas superficiales de las células blanco. Los receptores de alta afinidad del GM-CSF (GMR) consiste en dos subunidades ancladas transmembranalmente; un ligando enlaza a la subunidad α (tmGMR α) y una señal se traduce en la subunidad β (GMR β), ambas pertenecen a una superfamilia de receptores de citoquina estructuralmente conservada. Los receptores se expresan en un gran número de células, incluyendo blastos de leucemias agudas de la línea mieloide y linfoide^{114,138}. El GM-CSF estimula la producción de neutrófilos, monocitos/macrófagos y colonias de eosinófilos en cultivos de gel semisólido; también aumenta el crecimiento in vitro de progenitores eritroides y en algunos sistemas aumenta los precursores megacariocitos. El GM-CSF tiene múltiples acciones sobre la maduración final de la vía granulo-monocítica. Estos incluyen estimulación de síntesis de membrana y nucleoproteínas en granulocitos murinos, incrementando la adhesión neutrófila y expresión de adhesión de glicoproteínas de superficie, inhibición de migración de

neutrófilos, estimula la actividad fagocítica y citotóxica contra las bacterias, parásitos, levaduras y anticuerpos-cubiertos de células tumorales e incrementa la supervivencia de neutrófilos y eosinófilos in vitro; en la tabla 3.1 se resume la bioactividad del GM-CSF^{61,73}. Estudios in vivo han demostrado la eficacia de del GM-CSF para estimular los recuentos leucocitarios de granulocitos y macrófagos sin afectar otras células sanguíneas, ha despertado especial interés en el área clínica para su aplicación, sobre todo en pacientes granulocitopénicos o con enfermedades congénitas de los granulocitos^{127,189}.

Interleucina -11

La molécula de IL-11 tiene 199 aminoácidos parecida a la IL-6, se origina en células estromales, estimula el crecimiento celular del plasmacitoma, además tiene otras actividades que incluyen la inducción de la diferenciación de linfocitos B (una actividad dependiente de linfocitos T), tiene actividad sinérgica con IL-4 en el crecimiento de colonias multilineage (y actividad compartida con G-CSF e IL-6), e inducción de la formación de colonias megacariocíticas en colaboración con IL-3^{73,201}.

3.1.4. FACTORES SINERGISTICOS

Interleucina-6

La IL-6 es producida principalmente por monocitos y fibroblastos^{69,132}. Su actividad biológica es la de aumentar la secreción de las inmunoglobulinas, el crecimiento de células plasmáticas de

mieloma, e induce la diferenciación de linfocitos B y estimula directamente la proliferación y diferenciación de macrófagos granulocitos y progenitores megacariocitos. La IL-6 actúa sinérgicamente con IL-3 para mantener la proliferación de progenitores multipotentes (CFU-GEMM) murinos, y al crecimiento de colonias CFU-Meg , promueve la maduración de megacariocitos in vitro y estimula la producción de plaquetas in vivo; con M-CSF en el crecimiento de colonias de macrófagos y con GM-CSF induce el crecimiento de colonias de granulocitos; sinergiza con IL-4 en la inducción y proliferación de células T; sinergiza con IL-2 e IL-1 en la inducción de crecimiento de células T, co-induce la citotoxicidad de células T y estimula el crecimiento del plasmacitoma; induce síntesis de proteína en fase aguda en hepatocitos ^{73,106,132,172,201}.

El gen de IL-6 es expresado por células heterogénicas y es inducida por una variedad de factores, incluyendo la IL-1, TNF- α , y TNF- β , mitógenos y endotoxinas. La cadena α del receptor de IL-6 es codificado por un gen localizado en el cromosoma 1.

Hasta ahora no se ha demostrado el efecto directo de la IL-6 recombinante humana en la proliferación de cualquier célula hematopoyética humana,(sin embargo, funciona sinérgicamente con muchos factores de crecimiento hematopoyético actuando directamente ^{48,201}.

Factor Steel

El factor Steel también conocido como factor de células madre (Stem Cell Factor SCF), ligando c-kit, y factor de crecimiento de células mast; es una proteína glicosilada pesada que existe por lo menos dos formas en la membrana integral y dos formas solubles. Las formas solubles resultan de la división proteolítica de las formas de la membrana integral.

El factor Steel se localiza en el cromosoma 12q, la forma enlazada a la membrana tiene un peso molecular de 46 Kd, y la forma soluble de 30 Kd ^{36,73,201}.

Al parecer el ligando c-kit puede explicar los modelos murinos W/W^f y SL/SL^d que presentan anemia macrocítica, defectos menores en plaquetas, y en la producción de células sanguíneas blancas, esterilidad y defectos en el color del ratón, que aparecen como resultado de defectos en el receptor c-kit tirosin cinasa. Los animales SL/SL^d tienen el mismo fenotipo que los animales W/W^f pero tienen un defecto en el estroma medular ^{73,214,228}.

El ligando c-kit se encuentra normalmente en la membrana de las células estromales de ratón y rata, además, en forma soluble. La forma de factor Steel de membrana puede ser de mayor importancia para el mantenimiento del estady-state de la hematopoyesis más que la forma soluble.

La forma de factor Steel enlazado a la membrana integral esta ausente en las membranas estromales de animales SL/SL^d. Solo células estromales W/W^v sin células madre pueden curar animales SL/SL^d y administrando c-kit ligando a animales SL/SL^d disminuye parcialmente en forma reversible las anormalidades hematológicas. Células madre de animales SL/SL^d curan a animales W/W^v. Este modelo parece ser explicado por una proteína de membrana específica, c-kit ligando, y un receptor para el c-kit ligando para los cuales su interacción requiere de un soporte de células estromales que alimentan a células madre primitivas⁷³.

El dominio citoplasmático receptor del c-kit ligando o factor stell es una proteína de la membrana integral codificada por el protooncogen c-kit que funciona como una tirosin cinasa²⁰¹. Esto conceptualmente soporta un modelo de control local de células madre de médula por el estroma⁷³.

Su actividad biológica hematopoyética no esta completamente definida, no obstante, esta claro que no puede por si mismo inducir el crecimiento clonal de células progenitoras comisionadas. Sin embargo, este mejora substancialmente el número y tamaño de las colonias que se desarrollan in vitro cuando se añade a los cultivos IL-3, IL-7, ó EPO^{7,23,201,214}. La administración diaria in vivo de SCF además de GM-CSF da como resultado un incremento sinérgico de neutrófilos en médula ósea (ratón), pero no tan notable como el incremento sinérgico de neutrófilos circulantes que se observa con SCF más G-CSF (hiperplasia mieloide) después de 4 días de tratamiento en

comparación en lo observado con ambos factores solos. Esta observación provee un valor clínico en la terapéutica de neutropenia en pacientes mielosuprimidos ²¹⁵.

Factor inhibidor de leucemias (LIF)

Gearing ,et al. identificó otra citocina con habilidad para inducir la diferenciación de células leucémicas mieloides el cual se denomino factor inhibidor de leucemias (LIF) ¹⁰⁶.

El producto genético producido por la activación de los monocitos y células estromales de médula ósea humana es una glicoproteína con una secuencia de aminoácidos idéntica en un 78% al LIF murino. La actividad biológica del LIF humano y murino son similares ²⁰¹.

LIF al parecer no tiene actividad en células progenitoras normales, sin embargo, a pesar de la presencia de receptores celulares en líneas celulares de macrófagos, LIF parece ser tan potente como IL-6 para inducir la diferenciación de la línea celular leucémica M1. El LIF también esta involucrado en el metabolismo óseo; al igual que IL-6, el LIF puede inducir la expresión de proteínas en fase aguda por células hepáticas. Otra de sus actividades es su habilidad para actuar sobre células madre embriogénicas ¹⁰⁶.

Interleucina-4

Es un factor producido por un gen clonado a partir de linfocitos T y que tiene su actividad fundamental como activador de la proliferación y diferenciación de linfocitos B⁶⁹.

La IL-4 es enlistada como un factor sinérgico ya que células linfoides son más sensibles a IL-4 cuando han sido estimuladas por otros factores. Aunque tiene la capacidad para estimular el crecimiento de células mast, células T y fibroblastos e induce la expresión del gen de M-CSF y G-CSF en monocitos humanos. También induce la expresión de TNF- α o bien actuar como un inhibidor de la hematopoyesis en mezcla de células estromales de médula de murino²⁰¹. La IL-4 es un cofactor de múltiples vías mieloides. Entre sus múltiples actividades destaca la estimulación de células cebadas con eritropoyetina, en el desarrollo de las células eritroides y con G-CSF y M-CSF para estimular el desarrollo de granulocitos y macrófagos, respectivamente. Por otro lado, participa en la respuesta inmune induciendo la expresión del antígeno en macrófagos y en macrófagos cultivados induce actividad tumoricida. La IL-4 también estimula la fusión de médula ósea y macrófagos alveolares para formar células multinucleadas gigantes, las cuales son conocidas como células gigantes de Langerham's. Además, disminuye la migración de macrófagos en cultivo de agar causando su agregación, situación que precede a la fusión celular y promueve la diferenciación y el desarrollo de células pluripotentes. La adición de IL-4 a cultivos de agar con células de médula ósea produce la formación de algunas colonias de

granulocitos, macrófagos y células blásticas, lo cual indica que puede estimular su proliferación¹²⁷.

La IL-4 humana, incrementa la hematopoyesis dependiente de células estromales coestimuladas con factor Stem cell⁹⁶.

3.1.5. FACTORES QUE ACTUAN INDIRECTAMENTE

Interleucina-1

Es un factor producido principalmente por monocitos y macrófagos (mayor mediador de la respuesta inmune inflamatoria). La IL-1 es capaz de activar linfocitos T e induce la expresión de GM-CSF, G-CSF, IL-6 e IL-1 en células estromales; induce la proliferación y preactivación de linfocitos T, así como la síntesis de proteínas en fase aguda, promueve el paso transendotelial de los neutrófilos (induce el tránsito de los granulocitos en el peritoneo), y sinergiza con IL-3 estimulando la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas primitivas, estimula la producción de PGE (prostaglandina E) en fibroblastos, monocitos y neutrófilos, modula la expresión de los receptores de EGF (factor de crecimiento endotelial), induce el número de receptores de IL-2 y su actividad de enlace, e induce la maduración de células pre-B^{69,160,201}. También, es un excelente interactor encadenado con muchos otros factores, induce a las células madre primitivas en el ciclo, juega un papel en las últimas etapas de la activación de células T y B⁷³.

Factor de Necrosis Tumoral α

Conocido como TNF- α tiene una actividad citostática o citolítica contra numerosas líneas celulares y tumorales y ha podido ser clonado. Se caracteriza por su capacidad para producir grandes necrosis hemorrágicas en diversos tumores especialmente si se inyecta intralesionalmente. Es producido fundamentalmente por macrófagos^{69,173}.

El gen del TNF- α localizado en el cromosoma 6 ; comparte con la IL-6 un gran número de actividades biológicas heterogéneas y, semejante a IL-1 su mayor función es la de inducir la expresión de otros genes subordinados, los cuales, en turno funcionan como reguladores más específicos en la respuesta inmunológica y hematológica de la inflamación^{29,160,201,202}.

Aunque el TNF- α puede directamente inhibir el crecimiento de las células progenitoras hematopoyéticas (HPC), la habilidad del TNF- α para inducir la expresión de los genes de otros factores de crecimiento puede anular esta actividad inhibitoria al menos en la granulopoyesis y linfopoyesis²³⁵.

Así mismo se ha encontrado que el TNF- α es capaz de estimular fibroblastos, células endoteliales, y células de músculo liso para producir CSFs. Se ha mostrado que tanto TNF- α como IL-1 son capaces de estimular las células del mesénquima para producir tanto G-CSF como GM-CSF^{2,173}.

3.1.6. FACTORES INHIBIDORES

Como es el caso de muchos sistemas renovables, la inhibición de la proliferación de células hematopoyéticas puede estar controlada por la limitación en la producción de factores mitogénicos o por factores que inhiben el crecimiento celular mediante un fenómeno de frenado. Algunos moduladores activos de la hematopoyesis reducen la síntesis de factores mitogénicos y, al mismo tiempo, inhiben directamente la proliferación de células hematopoyéticas. Miembros de la superfamilia del factor de transformación de crecimiento- β (TGF- β) son excelentes ejemplos de tales factores inhibidores²⁰¹.

Factor de Crecimiento de Transformación- β

Se han encontrado cinco isoformas de TGF- β en vertebrados, desde TGF- β 1 hasta TGF- β 5 y cada TGF esta localizado sobre diferente cromosoma, y es expresado por múltiples tejidos y órganos, aunque existan múltiples excepciones estos factores funcionan considerablemente directa e indirectamente en la inhibición del crecimiento celular. Hasta la fecha cuatro receptores de alta-afinidad se han identificado, uno de los cuales es un proteoglicano²⁰¹.

Las isoformas más estudiadas son TGF- β 1, 2 y 3 ejercen efectos antiproliferativos sobre muchos tipos de células, en parte por inhibición de la fosforilación de la proteína Rb, un evento requerido para la progresión de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular, e inhibe el crecimiento de progenitores hematopoyéticos de todas las líneas en ensayos clonales en cultivos de largo termino in vitro^{91,93}.

El TFG- β es una molécula reguladora con efecto proliferativo sobre algunas células y efecto inhibitorio en otras. El TFG- β inhibe la formación de colonias de células spleen (bazo) de ratones normales. El efecto es más severo en células de ratón tratadas con 5-fluorouracilo⁹⁸.

El TGF- β 1 tiene efecto sobre tres estados de desarrollo de la megacariocitopoyesis. En sistemas de cultivo de agar utilizando médula ósea murina, se ha encontrado que inhibe el crecimiento de células formadoras de colonias megacariocíticas altamente proliferativas HPP-CFU-Mk dependientes de IL-1,3 y 6. También inhibe las CFU-Mk, y precursores de megacariocitos comisionados dependientes de IL-3 y 6. Su capacidad inhibitoria depende de las concentraciones de este factor y de la combinación de otros factores de crecimiento involucrados. Este efecto inhibitorio provee un posible mecanismo de lineaje específico que modula la producción de plaquetas⁹¹

Hay dos caminos por los cuales el TGF inhibe la hematopoyesis: (1) la proteína inhibe directamente la proliferación de células progenitoras, mediado en parte, por la inhibición directa de la fosforilación de la proteína Rb y adicionalmente por su capacidad de reprimir la expresión de receptores de GM-CSF, G-CSF, e IL-3, (2) TGF- β 1 interrumpe la capacidad inductiva de los factores (por ejemplo IL-1 y TNF- α) que estimulan la expresión de factores de crecimiento hematopoyético por células accesorias, incluyendo monocitos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T^{97,201}.

Inhibinas y activinas

Las inhibinas y activinas son proteínas diméricas de la superfamilia TGF- β y comparten una subunidad común. Activinas A y B son homodímeros de péptidos de las cadenas β_A y β_B y la activina A B es el heterodímero. Las inhibinas A y B son heterodímeros de una cadena α distinta y una de las dos cadenas de activina, estos factores son producidos en muchos tejidos y afecta un gran número de procesos biológicos; incluyendo la proliferación de ciertas líneas celulares y promoviendo la diferenciación eritroide in vitro²⁰¹.

La compleja actividad hematopoyética de la activina A y la inhibina A fueron identificadas por Broxmeyer y colegas quienes observaron que la activina A recombinante humana incrementa el crecimiento clonal de CFU-GEMM y BFU-E, pero no en CFU-GM, y que la inhibina A bloquea el efecto de la activina. También observaron la deplección de monocitos y/o linfocitos T de médula abrogada in vitro. El mecanismo como ocurre no es todavía claro, no se ha tenido estudios in vivo pero se ha documentado que efectos similares ocurren en animales intactos²⁰¹.

Interleucina-4

Este factor inhibe consistentemente la expresión de factores inductivos de la granulocitopoyesis IL-1 e TNF- α por fagocitos mononucleares, inhibe directamente ciertas respuestas proliferativas inducidas por factores mitogénicos, e inhibe la liberación de factores mitogénicos en células expuestas a factores inductivos de relevancia

biológica (ejemplo IL-1). Como es el caso con TGF- β , la IL-4 inhibe el crecimiento clonal de monocitos y macrófagos cuando se adiciona a cultivos clonales de células de médula humana. Sin embargo la IL-4 no inhibe la formación de colonias de neutrófilos, BFU-E, o CFU-E en crecimiento in vitro.

A pesar de no tener claro el papel que juega en la modulación de la hematopoyesis es posible que este funcione como un freno in vivo para la producción de macrófagos y linfocitos, actuando mejor en estos que, sobre megacariocitos y células eritroides²⁰¹.

Interleucina-10

Producida por una endotoxina inducida por monocitos y actividad mitogénica de linfocitos T CD4+, exhibe actividades biológicas heterogénicas. Aunque IL-10 es un factor de crecimiento de linfocitos B y células mast, esta actividad inhibitoria hematopoyética es extensa. IL-10 inhibe citocinas producidas por fagocitos mononucleares in vitro, inhibe la proliferación de células T y producción de IL-2, suprime IL-5-mediadora de la secreción de inmunoglobulinas inducidas por antígenos independientes de células T, y sinergiza con IL-4 y TGF- β hasta inhibir la citotoxicidad de macrófagos activados. El papel que juega la IL-10 en la hematopoyesis es aún incierto²⁰¹.

Prostaglandinas

Las prostaglandinas forman parte de la familia de los eicosanoides lípidos; son potentes reguladores de la hematopoyesis, y de la respuesta inmune. La PGE₂ es liberada por macrófagos y es conocida

su función tanto in vitro como in vivo como un supresor de la mielopoyesis, principalmente de la monocitopoyesis. La administración de PGE₂ en ratones recuperados de una dosis mielosupresiva de ciclofosfamida reduce la celularidad medular y el contenido de CFU-GM en el bazo de ratón tratado con IL-1. Los mecanismos por los cuales la PGE₂ media este efecto inhibitorio es desconocido, pero, se sugiere que la PGE₂ media la inhibición de granulopoyesis requiriendo de la participación de un factor producido por linfocitos T CD8+^{194,201}.

Interferones

Tanto IFN- α como IFN- γ indirectamente inhiben la hematopoyesis in vitro por inducir la producción de TNF- α (es un inhibidor directo del crecimiento de colonias, especialmente eritroides) por las células accesorias de estroma de médula ósea y por inhibición de la expresión de la IL-1 (e induce la expresión del gen del factor de crecimiento) por fagocitos mononucleares⁶⁸.

La capacidad del IFN- α para inhibir la granulopoyesis y la eritropoyesis ha sido ampliamente validado in vivo debido a su uso extenso del IFN- α en la práctica clínica²⁰¹.

Lactoferrina

Es una proteína enlazada a un metal, disminuyendo la producción de monocitos de GM-CSF^{140,228}.

La lactoferrina inhibe la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas tanto in vivo como in vitro de acuerdo a estudios realizados por Broxmeyer y colaboradores. Al parecer la lactoferrina inhibe la expresión del factor inductivo indirecto, IL-1 por monocitos²⁰¹.

Ferritina

Diversos estudios han mostrado que la cadena pesada de la ferritina (H-ferritin) inhibe el crecimiento de células progenitoras normales. El efecto inhibitorio de H-ferritin ha sido investigado utilizando un gran número de moléculas mutantes; demostrando que la capacidad de suprimir la mielopoyesis esta correlacionada con su actividad ferroxidasa (ferroxidasa convierte de Fe^{2+} a Fe^{3+})^{140,201,228}.

Factor de Necrosis Tumoral- α

El TNF- α inhibe el crecimiento de colonias granulocíticas pero este efecto es anulado por la capacidad del TNF- α de inducir la producción de factores granulopoyéticos por células accesorias. El TNF- α también inhibe el crecimiento de células progenitoras eritroides y la expresión del gen de la EPO; se ha demostrado que estos efectos existen in vivo, los cuales pueden explicar la supresión de eritropoyesis en enfermedades inflamatorias crónicas^{201,228}.

Estudios in vitro con células HPC CD34⁺ dependientes de IL-3 han demostrado que diversos mecanismos se llevan a cabo en la inducción del TNF- α , con lo que se inhibe el desarrollo de granulocitos (1) inhibición de la proliferación de células blásticas dirigidas a

granulocitos y; (2) inhibición de la proliferación de células granulocíticas comisionadas, efectos similares se han presentado en progenitores eritroides^{31,201}.

Hoy en día, debido a su considerable actividad farmacológica de las citocinas, éstas pueden ser usadas como modificadores biológicos de la respuesta inmune y hematopoyética.

La biotecnología permite que en la actualidad se produzcan industrialmente citocinas mediante el cultivo en gran escala de: a) líneas celulares productoras de una citocina particular, o b) Células procarióticas o eucarióticas a las que se les ha insertado el gene para alguna citocina.

Hasta ahora, las citocinas han sido empleadas¹⁸⁹. primordialmente para la terapia de enfermedades neoplásicas, demostrando que pueden ser benéficas para un número limitado de cánceres; sin embargo, el potencial clínico de muchas citocinas empleadas individualmente o en combinación, apenas está siendo explorado en algunas enfermedades de etiología infecciosa o autoinmune^{57,137,162,189}

CAPITULO 4

REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

Los estados de división, maduración y diferenciación están regulados por mecanismos homeostáticos complejos, basados en sustancias o factores estimulantes e inhibidores, los cuales controlan la supervivencia y el destino de las diferentes clases de células. Esta compleja red de moléculas biorregulatorias pueden actuar directamente sobre las células progenitoras hematopoyéticas, otras afectan a las células accesorias y otras pueden afectar tanto directa como indirectamente a las células hematopoyéticas^{2,85}.

En la actualidad se sabe que todos los tipos de células hemáticas derivan de una clase de células precursoras denominadas células madre hematopoyéticas, las cuales además de originar las células hemáticas puede producir células precursoras madre con capacidad proliferativa. En consecuencia representan una constante fuente potencial de células hemáticas que contrarresta el agotamiento de la población de células hematopoyéticas al mantener su capacidad intrínseca de autorrenovarse²³³. La autorreplicación de las células madre resulta en la producción de células hijas ambas de las cuales retienen la pluripotencialidad.

Se han planteado dos modelos de eventos replicativos (ver figura 4.1), el primero sostiene que ambas células hijas se vuelven a una línea de células comisionadas y un segundo modelo sostiene que

puede ocurrir una división asimétrica dando lugar a un progenitor comisionado y a un progenitor multipotencial. Este fenómeno se conoce como mitosis cuantal, y ha sido validado por Ogawa's y colaboradores²⁰¹.

Ahora bien un modelo de diferenciación sostiene que las células madre tienen un número limitado de receptores de factores de crecimiento (por ejemplo factor Steel e IL-3) pero no para receptores de crecimiento para líneas específicas, y que las comisionadas pueden ser definidas mejor por la nueva adquisición de receptores de líneas específicas.

Otro modelo sostiene que las células madre hematopoyéticas multipotentes, expresa bajos niveles de receptores de una multitud de factores de crecimiento de una línea específica o de multilínea y, los procesos de comisión resultan en la pérdida sistemática de muchos de éstos receptores. A pesar de los modelos antes descritos, sigue siendo un paradigma el como se lleva a cabo esta diferenciación²⁰¹.

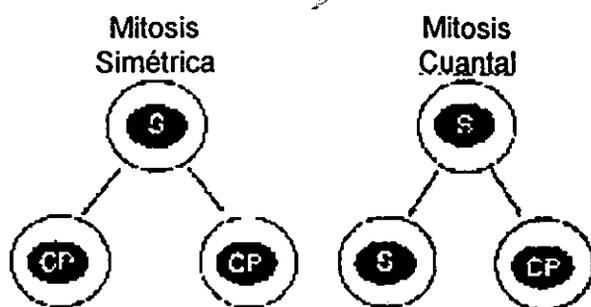


Fig. 4.1. Descripción de dos modelos de células madre (S) comprometidas: mitosis simétrica, en la cual cada célula hija es un progenitor comprometido (CP), y mitosis cuantal en la cual una célula hija es comprometida (CP) pero la segunda célula permanece no comprometida (S)(5).

4.1. REGULACIÓN DE LA ERITROPOYESIS

Dentro de los principales factores que regulan la eritropoyesis se encuentra la eritropoyetina la cual estimula la actividad mitótica de las células progenitoras eritroides tales como: BFU-E y CFU-E actuando también como factor de diferenciación de CFU-E a proeritroblasto y de la cual hablamos anteriormente.

Aunque el control fisiopatológico de la EPO no esta claramente definido, la hipoxia parece ser el factor fundamental para su producción postulándose que esta regulada por un nivel de oxígeno en un sensor celular eritrocítico ^{6,13,129,233}.

La EPO esta regulada por un mecanismo de feed-back, sin embargo además de los factores endocrinos que se encargan de la regulación de la EPO existen factores externos, como son factores químicos que indirectamente estimulan o inhiben la producción de esta hormona ⁶.

Factores estimulantes

Las prostaglandinas del tipo E y A así como la prostaciclina 2 (PGI₂) y un metabolito estable el 6-keto-PGE₁ estimulan la eritropoyesis in vivo, mientras que las prostaglandinas del grupo F la inhiben ^{6,129}.

Otros factores que inhiben a la EPO

Circunstancias que disminuyen la demanda de oxígeno por los tejidos, disminuyendo los niveles de EPO (deprivatización de proteínas, hipofisectomía o tiroidectomía). La presencia de metahemoglobina disminuye los niveles de EPO debido a que es incapaz de transportar oxígeno⁶.

Otros factores que intervienen en la eritropoyesis son GM-CSF, SF, IL-3, IL-9 e IL-10 que participan en la maduración del eritrocito. La línea eritroide esta constituida por una serie de estados representados en la figura (4.2)^{221,230}.

El primer progenitor comisionado en la línea eritroide es la unidad formadora de burst eritroide (BFU-E) en el cual actúan factores como IL-3 y GM-CSF estimulando el crecimiento de BFU-E. En esta fase se llevan a cabo de 11-12 divisiones.

El siguiente estado de maduración es la unidad formadora de colonias eritroides (CFU-E) en el cual la EPO actúa para llevar a cabo la maduración terminal del eritrocito, y en esta fase se llevan a cabo de 2-3 divisiones.

La fase de maduración de las células comprende los estadios en los cuales las células son morfológicamente reconocibles en proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo 1 y 2 , y eritroblasto ortocromático el cual por expulsión de su núcleo emerge como un reticulocito. Cuatro divisiones mitóticas ocurren en cada uno de los proeritroblastos produciendo 16 reticulocitos. El proceso de

maduración requiere de un periodo de aproximadamente 72 horas; en las siguientes 48 hrs. el reticulocito circulante madura en un eritrocito 228,229,230

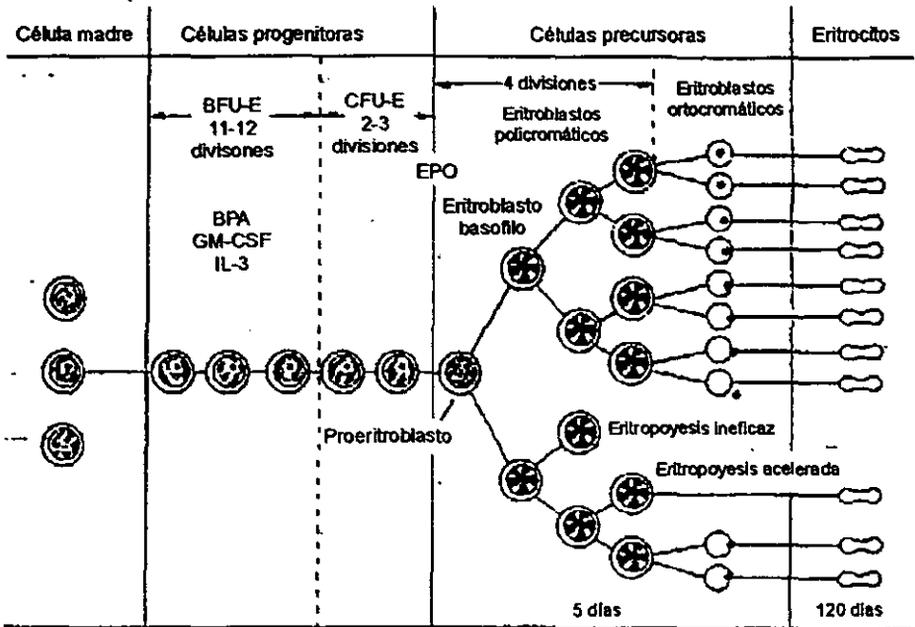


Fig. 4.2. Representación esquemática de los diferentes estadios de diferenciación eritroide (180).

4.2. REGULACION DE LA GRANULOPOYESIS

La granulopoyesis al igual que la eritropoyesis requiere una serie de elementos celulares, complejos bioquímicos, así como, la participación de las citocinas o Factores Estimulantes del Crecimiento que regulan su producción y maduración.

En la médula ósea se encuentran las células progenitoras y en menor cantidad en la sangre, las cuales dan origen en cultivos in vitro a colonias de granulocitos, macrófagos o de los dos. La célula

progenitora que da origen a granulocitos y a monocitos-macrófagos se denominó CFU-GM (unidad formadora de colonias-granulocitos-macrófago)¹³.

Las CFU-GM forman colonias únicamente en presencia de moléculas de glucoproteínas específicas a las que se les atribuyó el efecto de estimular su producción, que en conjunto se denominan factores estimulantes de colonias (CSF), además favorecen la maduración de células progenitoras normales en cultivo y también es necesario para la supervivencia de las CFU. Los CSF se han detectado en diferentes fluidos biológicos o tejidos de todas las especies de mamíferos estudiados. La radiación corporal completa, la exposición a antígenos, la inyección de endotoxinas, la infección bacteriana, o quimioterapia citotóxica aumenta la producción y liberación de CSF²²⁸.

Existen tres factores que actúan en la vía granulocito-macrófago el GM-CSF, G-CSF y CSF-1. Estos factores de crecimiento actúan primeramente sobre células madre comisionadas para granulocitos-macrófago, granulocitos, o diferenciación de macrófagos respectivamente.

Otros factores de crecimiento que actúan sobre la vía granulocito-macrófago son : IL-3, IL-4, IL-6 e IL-1^{201,228}.

El factor GM-CSF y la interleucina-3 son producidos por linfocitos T activados, los cuales son estimulados por los monocitos.

El G-CSF es elaborado por fagocitos mononucleares, células endoteliales y mesenquimales que son estimulados a su vez por citocinas tales como IL-1, TNF o productos bacterianos tales como endotoxinas.

El papel de los CSF en la estimulación de la producción de neutrófilos y su función como parte de la respuesta inflamatoria está bien definida. Durante el tiempo necesario de la defensa del huésped (invasión microbiana), los macrófagos y los linfocitos T son activados. Estos liberan CSF además de citocinas y linfocinas que provocan un aumento en la producción y maduración de neutrófilos.

La granulopoyesis es regulada por mecanismos de retroalimentación negativa, para inhibir la actividad proliferativa de las CFU-GM. Dentro de los cuales se encuentran la lactoferrina la cual es liberada por gránulos secundarios de granulocitos maduros e impide que los monocitos estimulen a los linfocitos T para que produzcan CSF.

La prostaglandina E (PGE) es producida por monocitos, la cual reduce la capacidad de respuesta al CSF de las células progenitoras en cultivo, posiblemente elevando sus niveles de AMPc. El CSF estimula la liberación de PGE por monocitos y, a la inversa la PGE estimula a los monocitos para que liberen CSF. De esta manera la PGE puede estimular o inhibir la granulopoyesis y monocitopoyesis¹³.

Se ha descubierto que las isoferritinas ácidas inhiben el crecimiento de precursores granulocíticos normales, pero no el de células leucémicas.

El CSF puede favorecer la maduración de precursores de granulocitos en cultivos indirectamente, por estimulación de la síntesis de una proteína que induce la diferenciación por otras células primitivas del cultivo. Esta secuencia de acontecimientos podría acoplar la proliferación con la maduración en la granulopoyesis normal¹³.

La forma secuencial de desarrollo del precursor de los neutrófilos es el mieloblasto-promielocito-mielocito-metamielocito neutrófilo en banda-neutrófilo segmentado.

El término granulocito se utiliza para referirse a los neutrófilos abarcando tanto a la serie del eosinófilo y basófilo²²⁸.

La serie granulocítica en la médula ósea se encuentra dividida en dos pool: un pool mitótico de células que se dividen y un pool postmitótico o de maduración de células que ya no pueden dividirse. El pool mitótico está compuesto por mieloblastos, promielocitos y mielocitos. A partir de éstos se cree que los precursores granulocíticos primarios experimentan cuatro o cinco divisiones en el compartimiento mitótico: una en la etapa de mieloblasto, una o dos en la etapa de promielocito, dos o tres en la etapa de mielocito; el tiempo de replicación es de aproximadamente 24 hrs.

El compartimiento postmitótico está compuesto por metamielocitos, bandas y granulocitos.

En estudios realizados con 3H-Timidina se ha demostrado que el tiempo aproximado desde la entrada de una célula en el compartimiento mitótico en la forma de mieloblasto a la aparición de sus granulocitos hijos se lleva a cabo en 10 días.

El índice promedio de la producción de granulocitos es de unos $1,6 \times 10^9$ /kg cada día ²²⁹.

Los neutrófilos en la sangre tienen un periodo de vida corto con una vida media de solamente 6 a 8 hrs. Estos neutrófilos funcionales llegan a ser senescentes de uno a 3 días y se pierden fortuitamente en la sangre y tejidos ²²⁸.

Las células progenitoras de los eosinófilos, reciben el término de CFU-Eo, son diferentes de las células progenitoras de los neutrófilos y monocitos. Los progenitores de los eosinófilos llegan a madurar y son liberados en la sangre de 3 a 6 días.

La eosinofilia inducida por infección parasitaria depende de la presencia de linfocitos funcionales. Recientemente, las evidencias indican que las citocinas incluyen GM-CSF de células estromales y mieloides además de IL-3 e IL-5 producidas por los linfocitos T activados en humanos siendo capaces de inducir la proliferación de CFU-Eo en eosinófilos maduros. El rango normal de Eosinófilos en el torrente sanguíneo es entre 100 y 300 por mm^3 (1% al 3% del total de leucocitos). La epinefrina y los corticoesteroides promueven la

proliferación de los neutrófilos de la médula, e inhiben significativamente la liberación de los eosinófilos de la médula ósea.

El ciclo menstrual, el embarazo y el stress emocional y físico influyen en la movilización de los eosinófilos de la médula hacia la circulación. Los eosinófilos de la sangre permanecen en la circulación con una vida media de 8 a 12 hrs. Estas células entran en los tejidos sobreviviendo de 7 a 10 días ²²⁸.

Los precursores de los basófilos toman cerca de 7 días para proliferar y madurar en la médula ósea; la IL-3 aumenta la proliferación de los basófilos. Los basófilos circulantes en la sangre constituyen menos del 1% del total de los leucocitos circulantes. Los corticoesteroides y las hormonas tiroideas suprimen la circulación de los basófilos ²²⁸.

Monocitos y Macrófagos

En el crecimiento de colonias de monocitos se requiere de hormonas referidas como CSFs. Los macrófagos juega un papel central en la regulación de la hematopoyesis; así mismo, elaboran dos hormonas hematopoyéticas: M-CSF y GM-CSF las cuales son capaces de estimular la producción de fagocitos mononucleares en la médula y tal vez en sitios de inflamación local. La producción de M-CSF y GM-CSF por macrófagos es estimulada por la exposición a estímulos externos tales como partículas fagocitables y endotoxinas. Tales estímulos inducen o incrementan la transcripción de los genes de dichos factores, con la producción resultante de la hormona. Los

macrófagos también producen citocinas que pueden regular la producción de ambos M-CSF y GM-CSF desde células endoteliales y mesenquimales. Así, la liberación de IL-1 y TNF por macrófagos causa que cierto tipo de células no hematopoyéticas produzcan hormonas que podrían estimular la producción de fagocitos mononucleares. Igualmente el factor GM-CSF puede inducir la expresión del gen del TNF en fagocitos mononucleares^{228,229}.

Los fagocitos mononucleares actúan como células centinela en la liberación de citocinas y hemopoyetinas que regulan la monocitopoyesis. Los fagocitos mononucleares su actividad y proliferación esta íntimamente ligada a linfocitos T activados. Las hemopoyetinas mejor estudiadas producidas por activación de linfocitos T y que interactúan con fagocitos mononucleares son GM-CSF e IL-3. Puesto que las células T son activadas como una respuesta de defensa del huésped. GM-CSF e IL-3 son importantes en la regulación local y en la proliferación de macrófagos y activación en la hipersensibilidad retardada de la respuesta inmune aunque estas hormonas no están circulando normalmente en sangre, y sus genes no son constitutivamente transcritos^{57,228}.

El M-CSF es el candidato más ligado en la producción día a día de los monocitos además de GM-CSF e IL-3; estas a su vez pueden inducir la producción de IL-6 la cual no induce la formación de colonias pero puede inducir la diferenciación de células mieloides entre monocitos, granulocitos, o megacariocitos. En una colonia con células diferenciadas, la inducción del crecimiento por los CSFs es así seguida

por la producción de otras citocinas, IL-6 puede inducir la diferenciación de diferentes líneas celulares. IL-6 podría ser el switch sobre otros, todavía no identificados, factores que son requeridos para determinar la especificidad del tipo de célula final⁵⁷.

Dentro de los inhibidores mejor estudiados son las prostaglandinas de la serie E, las cuales son producidas por fagocitos mononucleares y son potentes inhibidores específicos *in vitro*²²⁸. Así mismo, IFN α/β inhiben la división de los precursores de monocitos.

En la fig. 4.3 se muestra un modelo hipotético basado en la observación *in vitro*, de la regulación de la granulocitopoyesis y la monocitopoyesis²¹⁷.

Como ya vimos los monocitos-macrófagos y los granulocitos tienen una célula progenitora común dentro de la médula ósea los monocitos-macrófagos maduran de la siguiente manera: de la célula progenitora a monoblasto, a promonocito; a monocito; dentro de los tejidos de monocito a macrófago (en general, ésta línea celular es denominada *fagocitos mononucleares*⁵⁷. El tiempo de tránsito de un monoblasto a un monocito es aproximadamente de 6 días. Los promonocitos son las células más numerosas de la serie de los monocitos en la médula ósea, con un mayor pool de almacenaje conteniendo 6×10^8 células por kilogramo. Los promonocitos maduran en monocitos en la médula ósea y son liberados en la sangre aproximadamente en 2 días. Los monocitos circulantes en la sangre constituyen del 3 al 8% del total de leucocitos (300 a 600 células por mm^3 ; 0.3×10^8 células por kilogramo), mientras que de 3 a 4 veces

más monocitos se encuentran marginados en la sangre. Estos monocitos tienen una vida media de 1 a 3 días en la circulación; cada día aproximadamente 10^8 monocitos son liberados en la sangre desde la médula ósea ²¹⁶.

La migración de los monocitos de la circulación a los tejidos y cavidades del cuerpo sigue una secuencia de eventos en los cuales las moléculas de adhesión están involucradas. Los monocitos que entran a los tejidos llegan a ser transformados en el tejido convirtiéndose en macrófagos, los cuales permanecen por meses o aún años ^{57,228}.

En estudios realizados en los cuales se marcó a monocitos de ratón con ^3H timidina y en un único estudio realizado en pacientes hematológicamente normales se observó que el tiempo en el que los monocitos abandonan la médula ósea se lleva a cabo en 24 horas ¹³.

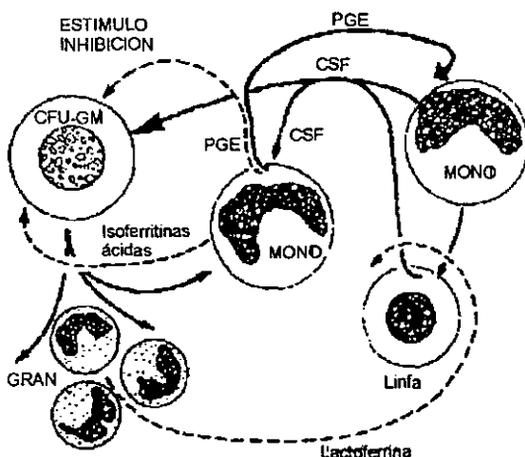


Fig. 4.3. Modelo hipotético, basado en observaciones in vitro, de la regulación de la granulocitopoyesis y la monocitopoyesis (13). (— estímulo, ---- inhibición)

4.3. REGULACIÓN DE LA TROMBOPOYESIS

Las plaquetas derivan de células de la médula ósea denominadas megacariocitos, mediante técnicas de cultivo in vitro se ha podido identificar la célula progenitora de megacariocitos denominada CFU-Mk (unidad formadora de megacariocitos) ¹³.

La Megacariopoyesis humana es generalmente considerada como un complejo fenómeno que incluye proliferación de células progenitoras comisionadas, maduración celular con poliploidización nuclear asociada (endorreduplicación), y crecimiento en tamaño y, producción de plaquetas ²²⁵.

La regulación de la trombopoyesis puede ser un proceso en dos etapas: a) la diferenciación de las células madres pluripotentes hacia progenitores eritrocíticos, granulocíticos, y megacariocíticos en la que actúan factores estimulantes que no son específicos sobre una línea celular y que regulan a las células madre y a los primeros progenitores aunque no son exclusivos de ellos. b) En la etapa de diferenciación terminal, en la cual participan factores que actúan sobre una línea específica y median la respuesta de depleción de la maduración de células circulantes ^{13,225,218}.

Los factores que actúan en la primera etapa son:

La IL-3 es el factor promotor principal de la formación de colonias de megacariocitos de ratón y humano encontrado en medios condicionados y se encuentra asociado a la presencia de GM-CSF en

dichos medios. El GM-CSF tiene una actividad sobrepuesta a la IL-3 sólo que en menor magnitud.

Además, IL-3 puede actuar como un factor de progresión en la entrada de las células a la proliferación y así mismo puede promover la diferenciación terminal de megacariocitos, macrófagos, eosinófilo y neutrófilos.

La IL-6 puede ser directa o indirectamente un factor de competencia actuando sinérgicamente con IL-3 para disminuir el tiempo gastado en la fase G_0 del ciclo celular por progenitores primitivos^{192,228}.

La IL-4 en combinación con EPO, IL-1 y otro factor induce in vitro la proliferación de progenitores megacariocitos.

Actividad Estimulante de Colonias de Megacariocitos en anemia aplásica (Mega-CSA), la cual es diferente de IL-3, GM-CSF, EPO y Trombopoyetina (TPO) ha sido encontrada en suero humano normal e incrementada en pacientes o perros en los que los megacariocitos medulares y/o CFU-Mk han sido deplectados por irradiación, quimioterapia intensiva u otras causas. Ha sido parcialmente purificada y puede ser neutralizada por antisueros específicos.

Factores que actúan en la diferenciación terminal:

Cinco actividades originadas de tres fuentes diferentes tienen dos pensamientos en común:

- 1) sólo estimulan la maduración

2) que no tienen un efecto en la formación de colonias de megacariocitos.

Factor Estimulante de Trombopoyesis (TSF)

En medios condicionados de células embrionarias de riñón humano muestran propiedades fisiológicas e inmunológicas de trombopoyetina. Ambas actividades incrementan el tamaño y conteo de plaquetas, la TSF y la TPO incrementa el número de megacariocitos detectados en cultivos, pero no eleva el número de CFU-Mk²²⁸.

Trombopoyetina (TPO)

La TPO ha podido ser ensayada in vivo. Se ha demostrado la presencia de trombopoyetina en el plasma de animales con trombocitopenia aguda provocada y en el plasma de algunos pacientes, aunque no en todos con diversos tipos de trombocitopenia^{13,85,228}.

La trombopoyetina se produce principalmente en riñón, y es responsable de la hiperploidía de los megacariocitos que será menor en condiciones normales que en condiciones de trombocitopenia. El estímulo de la ploidia se seguirá de aumento de tamaño celular y de la capacidad de la producción de plaquetas, de forma que megacariocitos más hiperdiploides, producen más plaquetas^{13,85,228}.

En recientes estudios se puede observar que la (TPO) funciona como: a) factor estimulante y como potenciador de megacariocitos b) actúa sinérgicamente con IL-3, GM-CSF, IL-9, y SF en colonias

mixtas c) actúa como un coestimulante junto con EPO sobre BFU-E
d) esto sugiere que la TPO funciona no sólo en trombopoyesis sino también en estadios tempranos de la hematopoyesis; e) También podría contribuir en el crecimiento anormal de líneas celulares de leucemia mieloblástica aguda, especialmente en combinación con otros factores de crecimiento hematopoyético ^{121,199}.

Factor Estimulante de Colonias de Megacariocitos.(Mk-CSF)

El otro agente humoral, descubierto más recientemente, afecta la fase inicial proliferativa de la megacariocitopoyesis estudiada in vitro. Esta sustancia se denominó Mk-CSF (factor estimulante de colonias de megacariocitos). Esta se encuentra en título elevado en el suero de pacientes con trombocitopenia grave y con aumento de la cantidad de megacariocitos en médula. La principal fuente actual de Mk-CSF es el suero de pacientes con anemia aplásica. La reducción de la masa megacariocitaria mediante citostáticos se acompaña de aumento de los niveles de Mk-CSF en el suero, mientras que la transfusión de plaquetas sigue de su disminución ^{13,85}.

Potenciador Megacariocito

In vitro el crecimiento de colonias megacariocíticas estimuladas en medios condicionados de células leucémicas de ratón (WEHI-CM) es favorecida por su suplementación con varios medios condicionados los cuales por sí mismos no estimulan la formación de colonias pero tienen efectos biológicos similares a la trombopoyetina. El potenciador

difiere de la IL-3 ya que tiene actividad in vivo en combinación con WEHI-CM y es producido por células parecidas a macrófagos.

Actividad liberadora de plaquetas

El plasma trombocitopénico contiene una actividad la cual acelera la liberación de plaquetas de megacariocitos.

Eritropoyetina

La inyección de 15 U de EPOr humana tiene un efecto en el aumento de tamaño de plaquetas y en la actividad de la S-sulfato, semejante a las 2.3 U de Factor Estimulante de Trombopoyesis (TSF). En cantidades relativamente elevadas la EPOr humana estimula la megacariocitopoyesis murina tanto en cultivos que contiene suero y los que no lo contienen ²²⁸.

FACTORES INHIBIDORES DE LA TROMBOPOYESIS

Factor de Crecimiento de Transformación β (TGF- β)

Se ha observado que en suero normal humano contiene uno o más inhibidores de colonias de megacariocitos lo cual llevo a la identificación de TGF- β , es una molécula ubicua, e inhibe la proliferación de CFU-Mk y el tamaño de megacariocitos reconocibles.

Interferón α y γ

Los interferones inhiben a la CFU-Mk así como a sus progenitores.

Inhibidor -Esplénico

La trombocitosis post-esplenectomía en animales podría deberse a la ausencia de un factor inhibidor esplénico, la administración de linfocitos esplénicos en ratones previene la trombocitosis postesplenectomía, quizá debido a la liberación de un inhibidor de formación de colonias de megacariocitos por estímulo de linfocitos T.

Acetilcolinesterasa (AChE)

Esta enzima puede ser secretada por diferentes tipos de células incluyendo megacariocitos. La inyección de un inhibidor de la colinesterasa (neostigmina) causa un aumento importante de CFU-Mk. Para controlar las concentraciones de acetilcolina en tejidos hemopoyéticos, la secreción de AChE por megacariocitos podría concebirse modulada por la actividad proliferativa de progenitores megacariocíticos.

Factores inespecíficos:

Estos factores actúan sobre la producción de plaquetas, dentro de los cuales se encuentran los estrógenos, menstruación, embarazo, glucocorticoides y metales²²⁸.

Regulación estromal de la trombopoyesis

Se tenían datos en los que el estroma medular regulaba la trombopoyesis actuando en el ciclo celular de CFU-Mk y secretando un número de factores como IL-3, 6 y GM-CSF. Sin embargo, en estudios recientes por Wickenhauser et.al.; los resultados obtenidos proveen

evidencia de que un número de citocinas son sintetizadas y secretadas por megacariocitos humanos y no sólo por células del estroma hematopoyético. Estos datos sugieren la existencia de un mecanismo autócrino y parácrino el cual puede influir en la maduración y diferenciación de megacariocitos o bien pueden actuar sobre varias células del estroma para mantener un apropiado microambiente hematopoyético²²⁵.

También se ha encontrado que los Glicosaminglicanos(GAGs) incluyendo el heparin sulfato, condroitin sulfato, el dermatan sulfato y el ácido hialurónico también estimulan el crecimiento de progenitores de megacariocitos de murinos, aumentando el diámetro individual del megacariocito en la presencia de suero. Sin embargo, en un sistema libre de suero el GAGs no tienen un efecto sobre la formación de megacariocitos, sugiriendo que éstos cooperan con algunos factores que se encuentran el suero. La heparina potencializa la actividad megacariocitopoyética del ligando c-mpl y de IL-6 pero no de IL-3, GM-CSF, SF y EPO. En suma el GAGs neutraliza significativamente la acción inhibitoria del factor plaquetario-4 (PF-4) y el TGF- β 1 en el crecimiento de colonias de megacariocitos. Estos resultados sugieren que la actividad estimulante del GAGs sobre la megacariopoyesis, está dada por modificación de la actividad de diversos factores que regulan el crecimiento⁷⁸.

Los estados de desarrollo de la trombocitopoyesis representados en el esquema (4.4). Los progenitores de megacariocitos originados de células madre pluripotenciales pertenecen a tres compartimientos

consecutivos. Progenitores Bipotentes (BFU-ME) generan colonias mixtas Eritroblásticas-Megacariocíticas y son probablemente el final de la multiplicación y el switch de la poliploidización por doble tiempo. Los precursores de Megacariocitos CFU-M1 y CFU-M2 son unipotenciales y tienen grandes posibilidades de entrar a la fase de poliploidización. Las células diploides comisionadas a poliploidización son denominadas promegacarioblastos (Pro MKB). Las células blásticas poliploidizantes son denominadas megacarioblastos. Estos llevan a niveles ploides al rededor de 4 N a 64 N. Ellos son seguidos por promegacariocitos que no sintetizan DNA y megacariocitos, los cuales liberan las plaquetas. Las plaquetas pueden ser liberadas en diferentes niveles de ploidia ejemplo 8 N, 16 N, 32 N, 64N.

El tiempo promedio en el cual se lleva a cabo la liberación de las plaquetas a torrente sanguíneo es de 8-12 días en humanos y su tiempo de vida media es de 6.9 a 9.9 días en humanos normales ²²⁸.

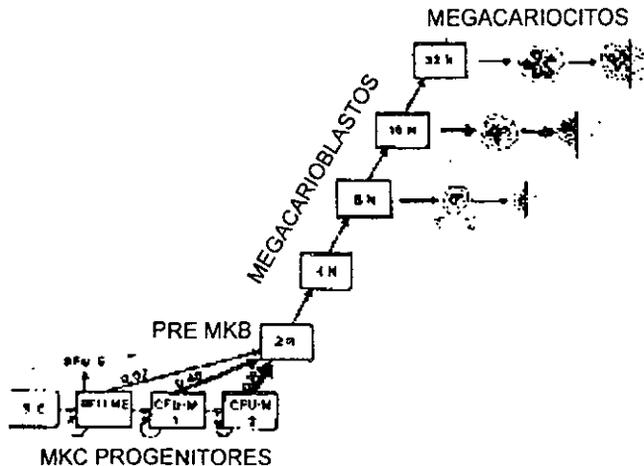


fig 4.4 Etapas de desarrollo de la trombocitopoyesis. (MKC) megacariocitos, (SC) stem cell, (Pro MKB) pre megacarioblasto(228).

CAPITULO 5

EXPLORACION CLINICA DE LA HEMATOPOYESIS

El estudio de la médula ósea tiene una importancia decisiva en una variedad de trastornos hematológicos, así como de la conducta a seguir.

La médula ósea se compone por una médula amarilla constituida casi en su totalidad por células adiposas y tejido conectivo de sostén así mismo esta constituida por una médula roja la cual posee una abundancia de células hemopoyéticas entre células adiposas y tejido conectivo ²²⁹.

Dentro de los métodos de obtención esta el aspirado medular y la biopsia medular de las cuales hablaremos a continuación:

5.1. ASPIRADO MEDULAR

Las indicaciones de exploración vienen determinadas por la existencia de anomalías en sangre periférica, bien de tipo cuantitativo, cualitativo o presencia de células anómalas.

También esta indicada en circunstancias en las que se sospeche de un proceso invasivo medular de naturaleza hematológica o no ⁸⁵.

TECNICA

Los sitios de aspiración dependerán de la edad del paciente y de la experiencia del operador, siendo los lugares de elección en adultos el esternón y las crestas ilíacas anteriores o posteriores, empleándose ocasionalmente las apófisis espinosas de las vértebras, las costillas y los huesos que contengan médula ósea (fig.5.1). En niños menores de tres años el sitio de elección es la superficie medio anterior de la tibia
15,94,229

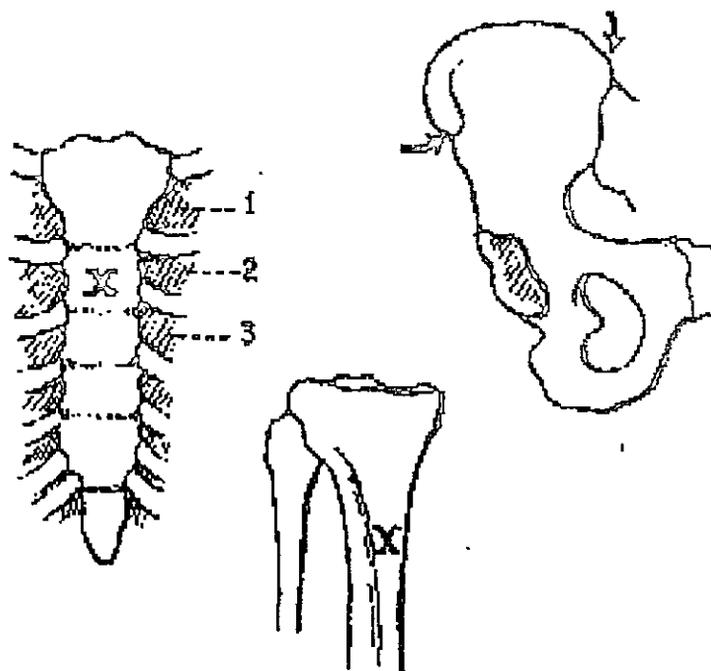


Fig. 5.1. Lugares que se utilizan para la aspiración de médula ósea (229).

La aspiración medular se lleva a cabo empleando medidas de antisepsia y con el empleo de guantes estériles, la zona a puncionar es desinfectada y se aplica un anestésico local generalmente del tipo de la procaína o la lidocaína, ambas al 1%. Después que el anestésico hace su efecto, se procede a atravesar la capa cortical del hueso mediante rotación de la aguja, advirtiéndose la penetración a la cortical por un ligero y rápido movimiento de la aguja hacia adelante, acompañado por un aumento en la facilidad de avance. El estilete de la aguja se retira rápidamente, se fija al pabellón o una jeringa de 10 ó 20 ml y se aspira 0.2 a 0.5 ml de líquido. Inmediatamente después se saca la aguja del hueso presionando ligeramente el lugar de la punción para facilitar la hemostasia. Una vez obtenido el aspirado este es colocado en un portaobjeto para proceder a su preparación, los grumos medulares se extienden sobre un porta efectuándose el mayor número de frotis posible, dos de los cuales se tiñen por tinción panóptica habitual reservándose los restantes para tinciones especiales que vendrán determinadas por los hallazgos morfológicos en su caso

15,85,94,229

En general esta exploración aporta importante información sobre la celularidad medular y detalles finos de morfología celular, permitiendo además la obtención de suspensiones celulares para estudios especiales de tipaje celular mediante anticuerpos monoclonales, citogenética, microscopía electrónica y cultivo celular

85,88

Es importante señalar que el estudio de la médula ósea debe, llevarse a cabo tras la sospecha diagnóstica, fundamentada en el estudio clínico, examen físico, de sangre periférica y datos bioquímicos, y raramente el estudio aislado de un frotis medular permitirá de por sí el diagnóstico ⁸⁵.

5.2. BIOPSIA MEDULAR

Permite el estudio histológico del órgano hematopoyético, ampliando la información citológica del aspirado con los aspectos estructurales, aunque no siempre refleja el estado de toda la médula. De todas maneras suele brindar un cuadro fiel de muchos trastornos del sistema hematopoyético y frecuentemente descubre la naturaleza de lesiones localizadas ^{85,228}.

La biopsia se puede intentar con la aguja de Westerman-Jensen que es una modificación de la aguja de Vim-Silverman, o con la aguja de Jamshidi-Swaim el cual proporciona excelente material de biopsia. Este dispositivo se compone de una aguja cilíndrica, de orificio constante, salvo una porción distal que se afila concéntricamente y termina con una punta cortante, biselada aguda. El estilete encaja exactamente dentro del orificio en la punta afilada, se engrana en el pabellón de la aguja y se extiende 1 a 2 mm más allá del extremo de la aguja (fig. 5.2) ^{85,228}.

La obtención de la biopsia medular se realiza con el paciente en decúbito lateral izquierdo o derecho, tomando precauciones de esterilidad y administrando al paciente la anestesia local adecuada, se

practica en la piel una incisión de 3 mm y se inserta la aguja con el obturador colocado a través de la incisión cutánea y del tejido subcutáneo hasta la cortical del hueso.

La aguja se dirige hacia la espina ilica anterosuperior y se adelanta con movimientos de torsión. La penetración de la cortical se advierte por una disminución de la resistencia a la progresión de la aguja. Después se retira el obturador y se adelanta la aguja con movimientos recíprocos en el sentido de las agujas del reloj y en contra, al rededor del eje longitudinal. Tras haber penetrado suficientemente en el hueso (hasta unos 3 cm) la aguja es rotada varias veces sobre su eje y retirada unos 2 a 3 mm. Luego se reinserta hasta la profundidad inicial variando ligeramente el ángulo, con cuidado de no doblarla, y se rota varias veces con el fin de liberar la muestra de las adherencias de la cavidad medular. A continuación se retira la aguja lentamente, usando el mismo movimiento de torsión empleado durante la inserción. El fragmento de médula dentro de la aguja es retirado mediante la instrucción del estilete a través de la punta cortante y expulsando la muestra biopsica a través del pabellón de la aguja. Las preparaciones histológicas pueden realizarse antes de fijar la muestra en solución Zenker al 95%: ácido acético glacial al 5%

14,85,229

La interpretación de la biopsia y aspirado de médula ósea ha alcanzado mayor importancia, particularmente en los estados de linfomas malignos y tumores sólidos y en transplantes de médula ósea, el examen de la médula ósea es valuable por dos razones tanto

pronósticas como terapéuticas y debido al desarrollo de técnicas de tinción, el uso de anticuerpos monoclonales y técnica de reacción en cadena de la polimerasa esto ha permitido detectar cantidades pequeñas de células malignas en médula ósea y sangre periférica (tabla 5.1) ¹⁴.

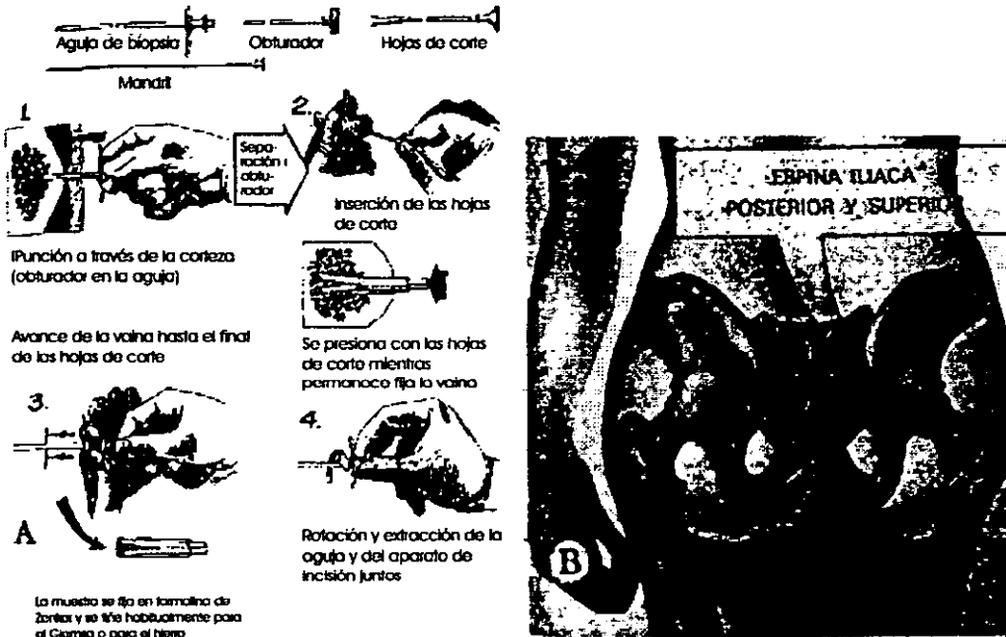


TABLA 5.1. DESORDENES EN LOS CUALES EL ASPIRADO Y LA BIOPSIA MEDULAR PUEDEN SER DIAGNÓSTICO DE UN DESORDEN ESPECIFICO ¹⁴.

Leucemia mieloblástica aguda con sus variantes.	Leucemia linfoblástica aguda.
Leucemia linfocítica crónica y sus variantes.	Leucemia de células peludas.
Leucemia granulocítica aguda.	Metaplasia mielogénica agnogénica.
Púrpura trombocitopénica Idiopática.	Trombocitopenia Esencial.
Anemia aplástica o hipoplástica.	Carcinomatosis de la médula.
Hongos y bacterias involucrados en la médula.	Macroglobulinemia de Waldenström
Osteoporosis.	Osteopetrosis.
Enfermedades como la de Gaucher's.	Púrpura trombocitopénica trombótica
Amilodosis.	Enfermedad sistémica de células mast
Desórdenes mielodisplásicos.	Anemia megaloblástica.
Anemia por deficiencia de hierro.	

5.3. CULTIVO IN VITRO DE PROGENITORES HEMATOPOYETICOS

Cultivo celular por definición es reproducir en seres vivos (in vivo) ó en medios adecuados (in vitro) la capacidad que poseen las células de proliferar y también, en ciertos casos, de diferenciarse tratando de conservar en lo posible las características morfológicas y genéticas de las célula(s) iniciadora(s) ¹³².

El desarrollo de técnicas de cultivo in vitro de las células hemopoyéticas ha supuesto un estímulo para la investigación hematológica. Su aplicación ha permitido un mayor conocimiento de las células hemopoyéticas no reconocibles mediante técnicas microscópicas por no poseer distintivos morfológicos precisos. Se trata

de las células germinales o células madre hemopoyéticas derivadas de la médula ósea adulta, de células movilizadas de sangre periférica y de cordón umbilical. Con esta metodología se intenta básicamente reproducir in vitro la capacidad que poseen las células hemopoyéticas para proliferar y diferenciarse en células sanguíneas maduras. Esta producción se consigue introduciendo las células progenitoras en un medio de cultivo adecuado, y en presencia de los factores estimulantes para cada línea celular ⁸⁵.

Los cultivos in vitro pueden ser **primarios** o **secundarios**; los cultivos primarios se forman a partir de una célula o fragmento de tejido que se colocan sobre un sustrato sólido en una interfase líquido-gas a temperatura constante. Realizando cambios del medio líquido ha intervalos periódicos pero sin afectar el crecimiento de las células sobre el sustrato sólido. Este tipo de cultivo tiene la característica principal de no ser inmortal ¹³².

El cultivo secundario se deriva de los cultivos primarios se le denomina también primera resiembra y consiste en tomar una o varias células del cultivo primario y crecerlas en condiciones similares a las que se encontraba inicialmente. El medio de los cultivos puede ser sólido o semisólido con una interfase sólido-gas o sólido-líquido-gas respectivamente. Una de sus aplicaciones es la propagación de una línea celular.

Por línea celular se tiene como principal característica la inmortalidad y es el producto de resiembras sucesivas de una clona de células ¹³².

Brandley y Metcalf en 1966, Pluznik y Sachs en 1965 ponen en marcha el cultivo in vitro de las células hemopoyéticas de ratón. En 1970 Pike y Robinson adoptan dicha metodología para el cultivo de células hemopoyéticas humanas.

El cultivo hematopoyético consta de una fase inicial de separación celular en la muestra medular o sanguínea y posterior suspensión de las células en el medio de cultivo que suele ser semisólido, ya sea en agar metilcelulosa o plasma coagulado. Estas sustancias proporcionan el soporte adecuado para el crecimiento celular y evita que las células que crecen formando agrupaciones emigren de las mismas, quedando las células hemopoyéticas y su progenie retenidas en una zona. De esta manera pueden ser observadas al microscopio invertido en forma de colonias (fig.5.3)^{85, 132,228}.

Los sistemas de cultivo semisólido son sistemas de corto término en los cuales los procesos de control fisiológico y fenómenos de cultivo declinan siendo difícil de mantener las células hemopoyéticas vivas por más tiempo.

Sobre este punto Dexter y colaboradores desarrollaron un nuevo sistema de cultivo líquido, en el cual la proliferación in vitro de células madre pluripotentes y producción de células precursoras de granulocitos pueden ser mantenidas por varios meses, significativamente el periodo de comportamiento cercano a la situación "in vivo", para el estudio de los mecanismos de control hematopoyético.

Estos sistemas de cultivo consisten en el establecimiento de una capa de células adherentes que contienen células mononucleares fagocíticas, células "epiteliales", y células grasas gigantes, a las cuales se les adiciona una población de células que contiene células hematopoyéticas primitivas (capa de células no adherentes). La capa de células adherentes provee múltiples funciones que mantienen en orden la hematopoyesis. Las citocinas y proteínas de matriz (estudiadas en los capítulos anteriores) son probablemente producidas por tales células adherentes; lo que permite que existan importantes interacciones celulares entre ellas y los progenitores hematopoyéticos⁴³.

A partir de estos sistemas se han desarrollado medios de cultivo específicos para cada línea celular dependiendo del objetivo de cada estudio. En particular nos interesa desarrollar los sistemas de cultivo que nos permitan estudiar la línea granulomonocítica que se encuentra principalmente afectada en las Leucemias mielomonocíticas crónica y agudas, los cuales estudiaremos posteriormente con más detalle

2,43,132,164

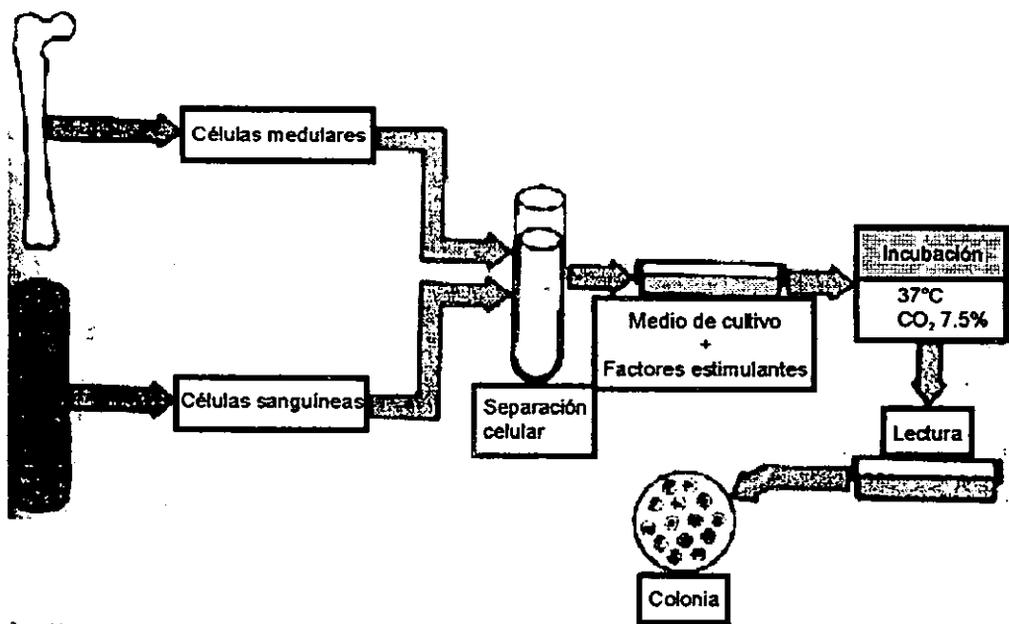


Fig. 5.3. Esquema del proceso de cultivo *in vitro* de progenitores hematopoyéticos (85).

CAPITULO 6

SINDROMES MIELODISPLASICOS

6.1. GENERALIDADES

El síndrome mielodisplásico (SMD) (de novo o secundarios) y el síndrome preleucémico (SPL) son sinónimos para un grupo de trastornos clonales proliferativos de la médula ósea que se caracterizan por la disregulación de la proliferación y diferenciación de una o más líneas celulares destacando a citopenias refractarias con disfunción celular y propensas a transformación leucémica y causar la muerte del paciente; así mismo, las hemorragias e infecciones pueden provocar un deceso ^{8,125,142,182}. Otros términos diagnósticos que son sinónimos con los de SMD/SPL o que se enmascaran con ellos son la leucemia mieloide subaguda, la anemia dismielopoyética refractaria, la leucemia aguda de bajo voltaje, el síndrome dismielopoyético y la displasia mieloide. ^{125,185}

La principal diferencia que distingue los síndromes mieloproliferativos de los SMD, es que en estos últimos, la proliferación clonal es generalmente ineficaz, mientras que en los síndromes mieloproliferativos, ocurre leucocitosis y una hematopoyesis aumentada hasta las etapas tardías de su historia natural ⁸.

Los mecanismos subyacentes que conducen a condiciones de proliferación ineficaz en la médula ósea no han sido aún establecidos.

CAPITULO 6

SINDROMES MIELODISPLASICOS

6.1. GENERALIDADES

El síndrome mielodisplásico (SMD) (de novo o secundarios) y el síndrome preleucémico (SPL) son sinónimos para un grupo de trastornos clonales proliferativos de la médula ósea que se caracterizan por la disregulación de la proliferación y diferenciación de una o más líneas celulares destacando a citopenias refractarias con disfunción celular y propensas a transformación leucémica y causar la muerte del paciente; así mismo, las hemorragias e infecciones pueden provocar un deceso ^{8,125,142,182}. Otros términos diagnósticos que son sinónimos con los de SMD/SPL o que se enmascaran con ellos son la leucemia mieloide subaguda, la anemia dismielopoyética refractaria, la leucemia aguda de bajo voltaje, el síndrome dismielopoyético y la displasia mieloide. ^{125,185}

La principal diferencia que distingue los síndromes mieloproliferativos de los SMD, es que en estos últimos, la proliferación clonal es generalmente ineficaz, mientras que en los síndromes mieloproliferativos, ocurre leucocitosis y una hematopoyesis aumentada hasta las etapas tardías de su historia natural ⁸.

Los mecanismos subyacentes que conducen a condiciones de proliferación ineficaz en la médula ósea no han sido aún establecidos.

Sin embargo se ha encontrado en algunos casos apoptosis prematura de la médula ósea ¹⁸².

La muerte celular programada (**apoptosis**) es un proceso normal por el cual las células son eliminadas durante el desarrollo embriogénico normal y en la vida adulta. Los estímulos que desencadenan la apoptosis pueden ser de carácter interno o del microambiente extracelular. Entre los primeros se encuentran el genotipo, alteraciones del DNA o el estado metabólico celular, mientras que entre los microambientales están la presencia o ausencia de señales químicas (hormonas, factores de crecimiento, citocinas etc.). A menudo, este "programa suicida" está implicado en la eliminación de células cuya sobrevivencia pone en peligro el organismo por lo cual actúa como un mecanismo de defensa. Durante la apoptosis, el DNA nuclear sufre una gran ruptura por acción de una endonucleasa, produciéndose cambios morfológicos del núcleo y del citoplasma seguidos de la muerte celular ^{126,145,178,180}.

La mayoría de los SMD presentan los siguientes hechos clínico-biológicos:

1. Son panmielopatías de naturaleza clonal; es decir es un conjunto de hemopatías adquiridas cuyo común denominador es su realización por expansión de una clona celular surgida por mutación unicelular de un progenitor multipotencial con clara proyección mieloide.

2. Exhiben un cuadro periférico de anemia macrocítica refractaria, con frecuencia acompañada de trombocitopenia y/o neutropenia.
3. La médula ósea suele presentar una hiper celularidad de precursores mieloides, con rasgos morfológicos dishemopoyéticos.
4. Desde el punto de vista funcional dicha médula muestra signos de hemopoyesis ineficaz.
5. Todo ello, en ausencia de otra patología concomitante (alcoholismo, hepatopatía, déficit en B12 o folatos, colagenosis, terapéutica citostática reciente, etc.).
6. Por último, en un 20% de los casos terminan realizando una transformación a una leucemia aguda, generalmente no linfoide (LANL) o "metamorfosis blástica" ^{14,87,182,184,185}.

6.2. FRECUENCIA

Aunque no existen datos fehacientes sobre la frecuencia de los SMD/SPL, en países occidentales podría aceptarse una tasa diagnóstica de 2-4 casos /100,000 habitantes al año ^{182,185}.

Su diagnóstico, aunque puede hacerse en todas las edades de la vida, se realiza, en más del 90% de las ocasiones, en sujetos mayores de 50 años y en un 50% en edades superiores a los 60 años. Exhibe una discreta preferencia por el sexo masculino. Tampoco esta bien esclarecido la frecuencia en la que los SMD/SPL preceden a LANL. La

frecuencia con la que los SMD progresan hacia una LANL alcanza hasta un 65% de los pacientes, pero en varias series extensas se ha puesto de manifiesto que una cifra más apropiada sería un 25%. Los pacientes que no progresan a leucemia aguda suelen morir debido a las complicaciones de sus citopenias o por enfermedades asociadas, ya que muchos de ellos están en los grupos de edad avanzada^{14,182,185}.

6.3. ETIOLOGIA

En la mayoría de los casos no se logra encontrar ningún factor aparentemente etiológico. El "envejecimiento" del pool germinal hemopoyético o el simple "azar" podrían ser circunstancias no cuantificables^{182,185}.

Por el contrario, en menos de los casos existen antecedentes de tratamientos previos con agentes mutagénicos (radiaciones y/o agentes citostáticos, fundamentalmente del grupo de alquilantes) y, más raras veces, contacto con benzol u otros solventes industriales. En algunos pacientes afectados con SIDA se les ha descubierto cuadros hematológicos compatibles con el diagnóstico de SMD^{180,182,185}.

No existe ningún hecho que avale un origen vírico aunque en modo alguno no puede descartarse¹⁴.

6.4. PATOGENIA

Al momento del diagnóstico los SMD parecen comportarse como panmielopatías clonales. Los estudios citogenéticos y bioquímicos a nivel celular (isoenzimas de la G6PD) así lo indican, lo cual no excluye como en otras hemopatías, un comienzo pluriclonal transitorio^{182,185}.

Parece ser que desde que el pool de progenitores pluripotentes (CGp) sufre el impacto de algún agente mutagénico o es objeto de una mutación al azar hasta que la neoclona llega a transformarse (cuando lo hace) el proceso sigue un curso multifásico^{182,185}.

Nuevas agresiones y/o de la propia inestabilidad cromosómica de la "tribu celular" anormal podrían ser las responsables de las nuevas etapas. En ocasiones, el estudio secuencial del cariotipo justifica esta "evolución clonal"¹⁸².

Es probable que en un SMD se lleve a cabo un tipo de activación de genes que codifican la síntesis de proteínas reguladoras de la proliferación y diferenciación celular. Algunos de estos genes, por ser análogos a ciertos oncogenes propios de retrovirus (v-onc) reciben el nombre de protooncogenes u oncogenes celulares (c-onc).

Diferentes circunstancias etiológicas (agentes químicos, radiaciones, virus, etc.) podrían "romper" el equilibrio fisiológico de tales estructuras génicas, a través de acciones tales como mutación, delección, translocación, duplicación, o simplemente activación anormal^{180,182,185}.

Existe un punto crítico en el mapa cromosómico en relación con los SMD: el brazo largo del cromosoma 5 (5q)¹⁸².

En una región concreta de dicho 5q están situadas estructuras genéticas tan importantes como: a) el c-onc fms (oncogen que codifica la expresión de los receptores de factores de crecimiento) y que en condiciones normales codifica la síntesis del receptor para el CSF-M; b) los genes que codifican la síntesis del CSF-M y CSF-GM, y c) el gen encargado de la síntesis del receptor celular para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)^{63,86}.

La deleción intersticial de esta área (5q-) es una de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en los SMD¹⁸⁵.

Recientemente se encontró activación del c-onc N-ras situado en los brazos cortos del cromosoma 1 en algunos SMD^{60,182}.

La familia de genes RAS (Ha-ras, Ki-ras y N-ras) codifican las señales de Transducción de proteínas las cuales están involucradas en la regulación y crecimiento celular. Las células de aproximadamente de un tercio de los pacientes de SMD y las de los pacientes de leucemia aguda mieloblástica (LAM) contienen mutaciones ras, principalmente de tipo N-ras, pero también algunas de tipo K-ras y raramente Ha-ras. El hecho de que estas mutaciones ras se encuentren preferentemente en la leucemia LAM-M4 (mielomonocítica), o en la LAM-M5 (monocítica), o en la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), sugiere una relación entre las mutaciones ras y la diferenciación monocítica. Los pacientes de SMD

con mutaciones del gen ras tienen una probabilidad más grande de progresar hacia la LAM. Sin embargo, la utilidad clínica de esta observación está por determinar^{60,86}.

Además existen aberraciones citogenéticas que incluyen deleciones de los brazos cortos o largos de los cromosomas 2,4,6,7,8,11,12,16,17 y 20. Otras alteraciones cromosómicas relacionadas con mutación a leucemia aguda se deben a translocaciones cromosómicas como: t (1:3), t (2:11), t (3:5), t (6:9), inversión 16, monosomía 7 y deleciones de los grupos 7 y 5 , 7q y 5q. Se ha encontrado que existe una hipermetilación en el gen 5' del área de la Calcitonina A en el brazo corto del cromosoma 11, como un hallazgo común, en SMD y leucemia aguda^{90,145,157,193}.

Se desconoce el mecanismo que determina el crecimiento preferente de la neoclona mielodisplásica sobre las clonas hemopoyéticas normales. La clona anormal inicia con frecuencia una lenta expansión autoperpetuable que se traduce, a nivel de sus precursores mieloides, en un bloqueo de su diferenciación con un claro componente de hemopoyesis^{180,182}.

Tratando de explicar la génesis de las citopenias Azra Raza y col., basándose en la existencia de una excesiva muerte celular apoptótica intramedular de células hematopoyéticas; debida posiblemente a una propiedad endógena de las células madre transformadas en la médula ósea o por un fenómeno mediado por citocinas, realizaron un estudio con 120 pacientes con SMD por marcación del extremo in situ (ISEL) de DNA fragmentado, encontrando evidencia de una apoptosis en un

76% de las biopsias de la médula ósea y 42 de 78 pacientes tienen niveles extremadamente altos de apoptosis. También encontraron niveles altos de $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $TGF-\beta$ en SMD comparados a los normales. Se planteó la hipótesis de que los SMD aunque son desórdenes de las células madre, la producción aberrante de citocinas conduce a un peculiar "efecto dual" en la que ellos estimulan la proliferación de progenitores tempranos llevando a una MO hipercelular y posteriormente induciendo apoptosis en la progenie madura causando citopenias variables.

En un estudio piloto en el que se empleo pentoxifilina, dexametasona y ciprofloxacina (llamada terapia PCD) las cuales interfieren con la vía de señalización lipídica de una variedad de citocinas incluyendo $TNF-\alpha$, $TGF-\beta$ e $IL-1\beta$ suprimiendo su actividad, dio como resultado una atenuación de las citopenias o bien eliminación de las clonas marcadas citogenéticamente. Estos datos confirmaron la hipótesis de que las citopenias son el resultado de excesiva apoptosis mediada por citocinas ¹⁶⁸.

En una cierta proporción de los casos (aproximadamente 20% tal bloqueo origina una lenta "acumulación leucoblástica" que termina exhibiendo rasgos de leucemia aguda¹⁴.

Debido a que muchos pacientes con SMD presentan anomalías inmunológicas, incluyendo reducción del número y depresión de la función de las células Natural Killer (NK) y depresión en la producción de interferón ($INF\gamma$) se ha encontrado que la $IL-12$

sola o con IL-2 pueden modular esta importante función inmunológica en muchos de los pacientes con SMD ¹⁴²

6.5. CLASIFICACION HEMATOLOGICA DE LOS

SINDROMES MIELODISPLASICOS:

ORGANIZACION FRANCO-AMERICO-BRITANICO (FAB)

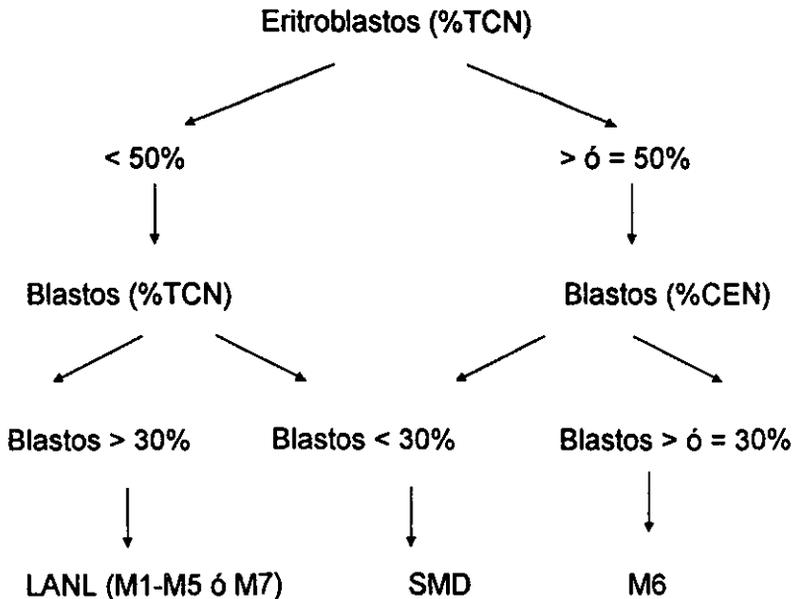
El grupo cooperativo franco-américo-británico (FAB) propuso una clasificación del tipo de blastos que definieron como blastos tipo I y II los cuales llevan las siguientes características:

1. Los blastos tipo I carecen de gránulos citoplasmáticos con la tinción de Romanowsky; no obstante, los gránulos primarios se demuestran con el microscopio electrónico o indirectamente mediante una tinción peroxidasa positiva; tienen nucléolos prominentes y una cromatina nuclear no condensada. La proporción núcleo-citoplasma (N/C) es más alta en los blastos pequeños que en los mayores.
2. Los blastos del tipo II contienen cantidades variables de gránulos (azurófilos) en la tinción de Romanowsky el núcleo sigue estando centralmente localizado, con un patrón de cromatina no condensada. La proporción N/C es inferior que en los blastos de tipo I.

3. Los blastos del tipo II deben distinguirse del progranulocito normal (promielocito), la célula deja de ser un blasto del tipo II cuando están presentes las siguientes características: a) el núcleo se hace excéntrico; b) el aparato de Golgi está bien desarrollado; c) la cromatina nuclear es más densa o está en forma de cúmulos; d) los gránulos son más numerosos; e) Hay una relación N/C menor ^{125,188,219}.

Utilizando el porcentaje y tipo de blastos presentes en médula ósea es posible proponer la forma en la que se pueden diferenciar un SMD de una LANL(fig 6.1).

Fig 6.1 Diagnostico diferencial de LANL vs. SMD de acuerdo al por ciento de blastos



TCN= todas las células nucleadas; CEN = células no eritroides; blastos = mieloblastos de los tipos I y II; LANL = leucemia aguda no linfocítica; SDMP= síndrome dismielopoyético) ¹²⁵

En el pasado se han realizado algunos intentos de clasificación de panmielopatías preleucémicas. Sin embargo, fue hasta 1982 que el FAB propuso una clasificación de lo que ellos llamaron SMD, basada en datos hematológicos simples como son: % y tipo de blastos presentes en sangre y médula ósea (tabla 6.1)

TABLA 6.1. Clasificación FAB de los Síndromes Mielodisplásicos ^{140,180,185,186,219}

TIPOS	Blastos (%)	
	Sangre	Médula ósea
Anemia refractaria "simple" (AR)	< 1	< 5
Anemia Refractaria Sideroblástica (ARS)*	< 1	< 5
Anemia Refractaria con exceso de blastos (AREB)	< 5	5 -20
AREB en transformación (AREB-t)**	> 5	20-30
Leucemia Mielomonocítica crónica (LMMC)***	< 5	5-20

Sideroblastos "en anillo" > 15 %, ** AREB con bastones de Auer, * Monocitosis periférica > 1;000/μl

Anemia Refractaria

Es probablemente similar a la llamada mielosis eritémica crónica. En aspirados de médula ósea tenidos con Wright una marcada hiperplasia eritroide megaloblástica. El número de proeritroblastos está incrementado, siendo algunos multinucleares. Los eritroblastos presentan un citoplasma burdo con punteado basófilo y otros muestran un núcleo en forma de trébol. Los macrófagos se encuentran

aumentados y frecuentemente muestran eritrofagocitosis y fagocitosis de normoblastos. La granulopoyesis está reducida, e incrementa el número de promielocitos atípicos y están presentes los micromegacariocitos^{14,186,219}.

Anemia Refractaria con siderblastos anillados

Las anomalías citológicas son similares a la AR con sideroblastos anillados > al 15%. En este desorden se observan gránulos burdos teñidos de azul vistos en normoblastos intermedios y posteriores. Estos gránulos sideróticos de tipo III representan iones férricos que se han acumulado dentro de la mitocondria de los normoblastos. Los gránulos sideróticos no son visualizados en proeritroblastos^{14,186,219}.

Anemia Refractaria con exceso de blastos

Representa otra expresión de la leucemia mieloblástica en la cual menos del 20% de mieloblastos son encontrados en la médula ósea y <5% de blastos en sangre. La leucemia mieloblástica aguda o leucemia mielomonocítica se desarrolla en una tercera parte de la mayoría de los pacientes quienes tienen anemia refractaria con exceso de blastos. Como en el caso de otros desórdenes preleucémicos, es esencial observar el patrón de evolución de estos desórdenes bajo el estudio de aspirados y biopsias medulares secuenciales.

En aspirados de médula ósea teñidos con Wright, obtenida de pacientes con AREB, se observa que es hiper celular con un número substancial de macronormoblastos intermedios megaloblastoides y

menos del 20% de mieloblastos pequeños. Se cree que estos pequeños mieloblastos se encuentran en una forma relativamente no proliferante o latente comparada con grandes mieloblastos, los cuales se piensa que son activamente proliferantes. Tal vez los mieloblastos pequeños son particularmente responsables relativamente del curso clínico indolente en muchos pacientes con AREB. En otras instancias, el curso clínico puede ser más fulminante con evolución leucémica rápida. Los megacariocitos están relativamente reducidos en número y estos pueden ser micromegacariocitos. La granulocitopoyesis está reducida, y algunos de los metamielocitos tienen núcleo aparentemente-aberrante. Los eosinófilos y macrófagos pueden estar incrementados en número ^{14,180,186,219}.

Cuando esta entidad se encuentra en los niños o en adultos jóvenes, es mejor considerarla con una LANL-M2 ^{14,186}.

Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación AREB-t

Incluye a los pacientes con más del 20% pero menos del 30% de blastos de los tipos I y II en la médula ósea. Pueden tener bastones de Auer en sus células blásticas. En la sangre periférica también puede haber más de 5% de blastos. A los pacientes de esta categoría se les considera en transformación de un SMD/SPL a una LANL clara. Habitualmente sufren una rápida evolución hacia leucemia aguda que puede tardar de semanas a meses ^{14,186}.

Leucemia mielomonocítica crónica LMMC.

La característica que define a la LMMC es monocitos en la sangre $> 1 \times 10^9/l$. La médula ósea muestra cualquiera de las características anteriores más la presencia de promonocitos^{66,186,219}

CAPITULO 7

SMD CON ALTERACION DE CELULAS PROGENITORAS GRANULOMONOCITICAS (G/M) PRINCIPALMENTE

Dentro del grupo de SMD según la clasificación FAB y de acuerdo a los objetivos del trabajo, es de interés desarrollar la Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC) ya que se encuentra alterada la clona celular de progenitores comprometidos granulo-monocítica (CFU-GM) como característica principal.

7.1. LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA (LMMC)

La LMMC es el menos frecuente de todos los SMD y se caracteriza por la presencia de monocitos en sangre periférica. Como síndrome clínico presenta un problema de clasificación, ya que tiene características de proceso mieloproliferativo por el patrón de crecimiento in vitro que es semejante a éstos, pero al mismo tiempo de SMD, por la importante displasia que presenta en todas las líneas celulares. En vista de la dishemopoyesis significativa la LMMC se considera como un SMD^{75,198}.

7.2. CUADRO CLINICO

En conjunto la evolución de los SMD es la siguiente: a) una pequeña proporción de los casos (<5%) el presunto SMD regresa hasta la normalidad, posiblemente por tratarse de situaciones dishemopoyéticas no clonales corregibles o reversibles; b) en un 30% de los casos el proceso permanece más o menos estables, sin necesidades transfusionales ni tendencia a la progresión, al menos durante muchos meses; c) el resto de los pacientes muestra una progresión en su fracaso hemopoyético, con necesidades transfusionales continuas, complicaciones infecciosas y hemorrágicas, hemosiderosis, insuficiencia cardíaca, hepatitis transfusional, y en algunos casos falla glomerular, etc. Una parte de este último grupo (que representa un 20% de todos los SMD) termina realizando una leucemia aguda, casi siempre Leucemia aguda no linfocítica (LANL)¹³⁴

Concretamente los pacientes con LMMC que se transforma en leucemia aguda presenta los siguientes criterios: el 20-30% de los blastos (mieloblastos de los tipos I, II y promonocitos) en la médula ósea, presencia de bastones de Auer y más del 5% de blastos en la sangre periférica^{14,125,163,219}

Se ha observado que en pacientes con SMD que presentan citopenia sin anemia, estos pueden progresan a leucemia aguda y raramente a leucemia mielomonocítica crónica. Los aspectos clínicos de estos síndromes pueden incluir fenómenos autoinmunes, especialmente encontrados en el subgrupo de LMMC (artritis, vasculitis cutánea etc)^{1,80}

La infiltración cutánea es muy infrecuente en las mielodisplasias, y sólo se ha referido ocasionalmente en la LMMC, ya sea en el momento del diagnóstico o, sobre todo, si está en fase de transformación aguda¹⁰⁴.

Se sabe que existe una serie de datos generales de mal pronóstico, como son: antecedentes de radioterapia y/o quimioterapia previas, pancitopenia periférica intensa, incremento progresivo de blastos medulares, alteraciones citogenéticas (sobre todo si son múltiples) descenso de la capacidad clonogénica de CFU-GM, etc¹⁸².

La propia clasificación FAB, con todos sus defectos, ha mostrado un cierto valor pronóstico, tanto en la supervivencia de los enfermos como en la incidencia de metamorfosis blástica (ver tabla 7.1). En los últimos años se han diseñado otros sistemas de pronóstico, basados en parámetros cuantitativos; dentro de las cuales destaca el realizado por Bournemouth (tabla 7.2) y el del grupo Sanz. Así mismo, los basados en parámetros cuantitativos y cualitativos son los sistemas de Varela y el propuesto por D.Rubio Félix^{14,72,125,176,185}.

Tabla 7.1 Síndromes mielodisplásicos. Valor pronóstico de la clasificación FAB^{14,182}.

Tipo	Metamorfosis blástica (%)	Mediana de supervivencia (meses)
AR	15	65
ARS	10	70
LMMC	30	10
AREB	30	10
AREB(t)	50	5

Tabla 7.2 SMD(s) : Estratificación pronóstica de los síndromes mielodisplásicos
Bournemouth^{14,176}.

Datos adversos	Puntuación
>5% de blastos medulares	1
<10 g/dl de hemoglobina	1
< 100.000 plaquetas/ μ l	1
< 2.500 neutrófilos/ μ l	1
Grupos (puntos)	Mediana de supervivencia (meses)
A (0-1)	62
B (2-3)	22
C (4)	8

Estos sistemas de puntuación hace posible el papel predictivo con respecto a la evolución hacia una leucemia aguda.

7.1.2. PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO DE LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA.

El diagnóstico de cualquier tipo de SMD incluye aspectos básicos como: estudio morfológico de la sangre periférica, médula ósea y de la biopsia de hueso, presencia o no de blastos así como la presencia de sideroblastos patológicos en anillo etc., además realizar un estudio con batería de anticuerpos monoclonales^{87,125,180,186}.

La inclusión de la LMMC dentro de la clasificación de los síndromes mielodisplásicos efectuada por el FAB puede juzgarse como coherente si se considera que presenta una expresión citológica medular muy afín a la de la AREB, con presencia de promielocitosis-promonocitosis y abundantes signos morfológicos dishemopoyéticos. Su rasgo distintivo es la monocitosis periférica con que cursa y que el FAB exige que sea superior al $1 \times 10^9/l$, sin precisar si los monocitos deban ser más o menos dismórficos ^{75,180,185}.

La LMMC se ha confundido con casos claros de ARS, AREB y AREBt por el único hecho de cursar con monocitosis superior al $1 \times 10^9/l$, sin promonocitosis medular atípica ni suficiente abigarramiento de los monocitos periféricos ^{75,180}.

7.1.2.1. Biometría Hemática

- a. La anemia suele ser macrocítica oval o bimórfica. A veces hay siderocitos. Raramente se ven glóbulos rojos nucleados.
- b. En contraste con otros SMD la LMMC es más leucocítica, con una mediana leucocitaria de $12.9 \times 10^9/l$. Hay una monocitosis persistente con un recuento de monocitos que supera los $1.000/\mu l$. Invariablemente hay neutrofilia. Los granulocitos inmaduros pueden estar presentes en pequeñas cantidades. La hipogranulación de los neutrófilos es una característica frecuente.

- c. El recuento de plaquetas es normal o bajo, y se suelen observar plaquetas dismórficas ¹²⁵.

7.1.2.2. Médula Osea

- a. En médula, la eritropoyesis es normal o disminuida, y puede incrementarse el número de proeritroblastos. La mayor parte de la eritropoyesis, presenta células de tipo megacarioblastoide. En algunos normoblastos puede ser identificado un núcleo con configuraciones aberrantes y el citoplasma puede exhibir puntilleo basofílico burdo.^{125 7} Puede haber sideroblastos anillados^{14,125}.

Se han realizado estudios ultraestructurales en pacientes con SMD y en especial el trabajo realizado por Feliu el cual efectúa una valoración semicuantitativa de las principales alteraciones nucleares y citoplasmáticas de los eritroblastos. Encontrando que las alteraciones más frecuentes en las LMMC son los "clefts" (hendiduras de la cromatina localizadas sobre el núcleo) y las "blebs" (hendiduras de la cromatina en el borde de la membrana nuclear)⁵⁰.

- b. Habitualmente hay una hiperplasia granulocítica, y pueden estar incrementado el número de eosinófilos y promielocitos; existe de forma constante, una promonocitosis medular que no se da en el resto de los SMD. Las células plasmáticas están incrementadas en número y al parecer son morfológicamente normales. También se pueden apreciar características

disgranulopoyéticas. Los blastos tipo I y II pueden estar aumentados hasta en un 20%, aunque frecuentemente su aumento es inferior al 5%. Un mínimo del 20% de todas las células nucleadas de la médula son células monocíticas. A veces es difícil demostrar el componente monocítico con la tinción de Romanovsky y es necesaria una tinción citoquímica específica para monocitos. En la LMMC, los monocitos son monótonos en algunos casos y en otros son pleomórficos. En contraste a la monocitosis universal encontrada en la médula en leucemia monocítica aguda, en la leucemia mielomonocítica crónica la monocitosis es menos obvia ^{104,125,180}.

En el estudio ultraestructural realizado por Feliu los hallazgos encontrados en LMMC son, desgranulación de los neutrófilos y monocitos, tanto maduros como inmaduros, vacuolas citoplasmáticas, bolsillos nucleares, distribución anormal de las granulaciones y disociación madurativa núcleo-citoplasmática ⁵⁰.

- c. Puede existir dismegacariocitopoyesis y algunos pueden ser micromegacariocitos que tienen un núcleo y en ocasiones una pequeña lobulación nuclear su citoplasma es escaso y con granulación abundante ^{14,125}.

En los estudios ultraestructurales en LMMC se encuentran frecuentemente dilataciones vacuolares de gran tamaño localizadas en el citoplasma y en la sistema perinuclear y megacariocitos hipogranulares ⁵⁰.

7.1.2.3. Métodos Citoquímicos

Los procedimientos de coloraciones citoquímicas se han establecido como auxiliares en la identificación de diversos tipos de células en los SMD y sus subtipos.

Algunas técnicas empleadas para este fin están basadas en la demostración de ciertas enzimas y constituyentes químicos de las células los que caracterizan la tendencia y grado de diferenciación de las mismas ²³¹.

Reacción de la mieloperoxidasa

Las peroxidasa son hemoproteínas de naturaleza enzimática que cataliza la oxidación con H_2O_2 en una gran cantidad de sustancias. La peroxidasa granulocitaria no se encuentra en los linfocitos. El principio de la reacción es de un substrato que produce un color intenso y estable. El substrato comúnmente utilizado es la bencidina que por oxidación con H_2O_2 produce un color café-verdoso derivado de la safranina en el sitio de acción de la peroxidasa ^{14,75, 198}.

Interpretación: Todos los elementos eritroides jóvenes como adultos, así como los elementos granulocitarios en toda su gama de maduración son positivos a esta reacción. El tejido linfoide es negativo. En la LMCM la prueba resulta positiva ^{14,75,81,198}.

Reacción Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

El ácido peryódico libera grupos aldehídos en los componentes del tejido. La liberación de estos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff el cual da un color rojo. La reacción más frecuente es con compuestos que contienen uno o más azúcares. La intensidad del color varía de acuerdo al número de grupos de aldehídos los cuales son los que producen el primer estado de la reacción, a medida que la célula madura la coloración aumenta^{14, 81,166}.

Interpretación: Los neutrófilos reaccionan con todas las fases de desarrollo, con mayor intensidad en la fase de maduración. Los monocitos presentan una reacción de coloración leve en forma de finos gránulos. Los blastos presentan una importante cantidad de gránulos de color rojo de tamaño y forma irregular en leucemia linfoblástica. El PAS en LMMC muestra puntos en forma de tinción difusa^{75,81,166}.

Reacción de Esterasas Inespecíficas con Inhibición con NaF

Todas las células tienen diversas clases de enzimas esterazas las que con el empleo de alfa-naftilbutirato se precipitan en el citoplasma dando una granulación escasa y fina de color café.

Debido a las características del tejido monocitario (aún en sus precursores directos) la reacción señalada se evita completamente al agregar a la mezcla de tinción una pequeña cantidad de NaF, impidiendo su demostración en tanto que en todas las demás células blancas esta inhibición es inexistente^{166,198,219}.

Interpretación: Las laminillas teñidas con NaF agregado, si son de estirpe monocitaria no ofrece coloración alguna. Citoquímicamente, los monocitos en leucemia mielomonocítica crónica pueden ser identificados mediante el uso de esta reacción, el número de monocitos incrementado puede ser identificado ^{14,75,166,219}.

Tinción de Azul de Prusia de Gomori (tinción de Hierro).

Esta reacción emplea una solución fresca de ferrocianuro ácido para demostrar hierro no hem tal como aparece en los compuestos de almacenamiento de hierro ferritina y hemosiderina. El hierro de ambos compuestos esta poco ligado y se desenmascara fácilmente con ácido diluido, dando las reacciones con hierro iónico. Una de estas reacciones es la formación de un pigmento azul, el azul de prusia, un ferrocianuro férrico resultado de la combinación de iones férricos con cianuro ¹⁹⁸.

Interpretación: se examinan preparaciones de médula ósea y cortes de coagulo de la misma, el hierro intracelular esta situado dentro de los siderositos, sideroblastos y macrófagos. Por lo que en la LMMC la tinción de hierro con azul de prusia puede demostrar pocos anillos sideroblastos y este a su vez nos distingue de una AREB ^{14,81,180,198}.

7.1.2.4. Lisozima

La lisozima, proteína catiónica rica en arginina, cuya actividad en los gránulos primarios corresponde a una tercera parte del total de dicha actividad enzimática, se localiza también en los granulocitos

neutrófilos. La lisozima (muramidasa) puede calcularse mediante un método turbidométrico observando el descenso en la actividad óptica producido en una suspensión de *Micrococcus lysodeiktticus*, cuando es expuesta al suero u orina, en comparación con el descenso en la densidad óptica producido por una concentración conocida de lisozima de la clara de huevo, también puede medirse por método inmunológico 75,81,180

Interpretación: la lisozima suele estar elevada en LMMC lo cual no se da en AREB.

El estudio citológico medular e histológico de la biopsia son complementarios al de sangre periférica y son requeridos para información diagnóstica en pacientes con SMD ^{14,185,219}

7.1.2.5. Estudios Citogenéticos

En los últimos años se ha hecho evidente que las anomalías cromosómicas recurrentes observadas en las leucemias y otras enfermedades hematológicas malignas son parte integrante de un proceso de transformación celular. Muchas de las alteraciones citogenéticas recurrentes están asociadas casi característicamente a tipos particulares de enfermedades, contribuyendo así a su diagnóstico. La identificación de los genes que están implicados en estas recombinaciones cromosómicas, podrían contribuir decisivamente al conocimiento de la biopatología de estas células y permitirá definir grupos de pronóstico y tratamiento específicos ¹⁵⁶

La LMMC cursa a menudo con anomalías cromosómicas que, con frecuencia, consisten en deleciones y duplicaciones y, en menor grado, en translocaciones e inversiones como suele ocurrir en todos los SMD. Se acompaña, en general, de una breve supervivencia^{75,180}.

Dentro de las LMMC se han descrito casos en los que estos desórdenes mielodisplásicos se encuentran presentes translocaciones cromosómicas como t (8;9) (p11;q34) así como anomalías cromosómicas 1 y 7 las cuales preceden a una leucemia aguda (Leucemia mielógena aguda)^{90,139,193}.

7.1.3. TRATAMIENTO

No se tiene un tratamiento específico para la LMMC, ya que su evolución clínica presenta las mismas características de todos los SMD y por lo cual debe tratarse en base a la evolución clínica de cada individuo, empleando todos los recursos terapéuticos posibles.

Por su propia naturaleza, la anemia de los SMD suele ser refractaria a los hematínicos convencionales (B₁₂, folatos, B₆, etc.) aunque conviene realizar una terapéutica de prueba, de algunas semanas, con todos ellos^{66,182,219}.

En raras ocasiones se ha mejorado discretamente la anemia con la administración temporal de andrógenos y/o esteroides suprarrenales y la trombocitopenia con danazol⁶⁶.

Cuando la anemia llega a límites intolerables no existe más remedio que realizar una hemoterapia programada, con concentrados de hematíes. El riesgo seguro de hemosiderosis puede aminorarse, en aquellos casos con un pronóstico evolutivo largo, con la administración de desferroxiamina en infusión subcutánea nocturna ¹⁸².

7.1.3.1. Terapia hormonal

Las complicaciones infecciosas habrá que tratarlas con antibioterapia intensa (empírica o específica) y las hemorragias con administración temporal de esteroides y ácido epsilonaminocaproico, reservando los concentrados de plaquetas para las manifestaciones graves. Se han empleado corticoesteroides en algunos pacientes mejorando sus problemas de citopenias y requerimientos transfusionales tales respuestas resultan anecdóticas y puesto que este tipo de tratamiento expone al paciente a la posibilidad de infección, no se usa cotidianamente ^{168,180,182}.

7.1.3.2. Inductores de diferenciación celular

Se ha intentado vencer el bloqueo madurativo de algunos SMD (sobre todo AREB AREB-t) con una serie de agentes que han mostrado su eficacia in vitro como inductores de la diferenciación celular ^{168,180}.

El más utilizado hasta el momento es el arabinósido de citosina (ARA-C) a bajas dosis (10-20 mg/m²/día, por vía subcutánea, durante 2-3 semanas). Con este tipo de tratamiento se ha logrado hasta un

20% de remisiones completas en AREB y AREB-t, generalmente de corta duración ^{92,168,180,185}.

En la mayoría de las ocasiones dicha remisión no ha sido consecuencia de una "diferenciación celular" propiamente dicha sino de una fase aplásica superada por la hemopoyesis residual normal ^{168,182,185}.

El efecto diferenciador se ha intentado con otros agentes, tales como el ácido cisretinoico y la 1,25 (OH)₂-D₃, con resultados poco alentadores ¹⁸².

El ácido 13-cis retinoico ha demostrado en líneas leucémicas HL-60 y en líneas de leucemia promielocítica, inducir una capacidad de diferenciación siendo utilizado en casos de LMMC ^{21,168}.

7.1.3.3. Citocinas hematopoyéticas

Resultados de estudios realizados mediante el uso de factores estimulantes de colonias (CSF) en SMD han mostrado aumento en la diferenciación mieloide y minimizar la degeneración neoplásica mejorando los niveles de los neutrófilos para reducir la infección y mejorar la calidad de vida ^{168,180}.

En el ensayo con GM-CSF se observó incremento de neutrófilos, su impacto ha sido transitorio desapareciendo con la suspensión de GM-CSF y asociado con la expansión de una clona neoplásica. El impacto en la clona neoplásica puede ser minimizado con terapia de restricción en paciente con bajo conteo de blastos pero clínicamente

relevante en citopenias. en algunos ensayos la administración de GM-CSF tiene un potencial de restauración ya que aumenta la función antimicrobial y antitumor de los monocitos después de quimioterapia a altas dosis ^{168,227}.

En un estudio realizado con G-CSF se observó que produce elevación del conteo de neutrófilos sin progresión a leucemia ¹⁶⁸.

La administración de IL-3 en pacientes con SMD con severas citopenias dependiente de transfusión, produjeron una elevación en todos los neutrófilos y una elevación de plaquetas, permitiendo cesar las transfusiones en algunos pacientes con trombocitopenia profunda o disminuida. Desarrollándose trombocitopenia transitoria en otros ^{47,168}.

La EPO administrada en pacientes dependientes de transfusiones de células rojas en pacientes con SMD puede reducir la eritropoyesis ineficaz y reducir los requerimientos de transfusión ^{168,180}.

La disponibilidad de citocinas hematopoyéticas recombinantes ahora proveen de una nueva terapéutica aprovechable para el tratamiento de enfermedades o en el tratamiento relacionado con la supresión hematopoyética ^{168,180,182}.

Aunque GM-CSF , G.CSF, e IL-3 pueden ser utilizados en pacientes con SMD produciendo un efecto deseado sin embargo, el impacto a una evolución a enfermedades neoplásicas debe ser observado cuidadosamente ^{73,168}.

7.1.3.4. Quimioterapia

El tratamiento de LMMC se realiza mediante quimioterapia en la cual la destrucción de la clona anormal constituye la única oportunidad de conseguir curación y dentro de los agentes citotóxicos más empleados se encuentra el citarabino (Ara-C) que ha sido utilizado a dosis diversas y en diversas combinaciones con otros agentes citoreductores tales como: mitoxantrona, etopósido, fludarabina etc
21,168,182

Cabe mencionar que no todos los pacientes responden a la quimioterapia citotóxica y que algunos estudios muestran resistencia multidroga⁶⁶.

Los índices de remisión completa son generalmente favorables restaurándose la hematopoyesis normal. Desafortunadamente en la mayor parte de las series, hay toxicidad con incidencia variable de muertes tempranas. La respuesta no es duradera con sobrevida libre de enfermedad de un año o más en casos excepcionales y por ello se considera al trasplante de células progenitoras como la terapia a seguir^{188,180,200}.

La poliquimioterapia apenas si encuentra indicación dada la edad avanzada de la mayoría de los pacientes con LMMC y sólo en pacientes jóvenes con donante compatible se ha consignado algún resultado aislado favorable mediante el trasplante alogénico^{66,168,180}.

CAPITULO 8

LEUCEMIA AGUDA NO LINFOCITICA (LANL)

8.1. DEFINICION Y GENERALIDADES

La leucemia es una neoplasia que se caracteriza por la proliferación y acumulación de precursores hematopoyéticos malignos. Estas células pueden encontrarse no solo en la médula ósea, donde de hecho se originan, sino también en la sangre periférica y además pueden infiltrar cualquier órgano o tejido del organismo^{58,84,125,158}.

Las leucemias pueden clasificarse en agudas ó crónicas en relación a sus mecanismos fisiopatogénicos de acuerdo a la falla en la diferenciación celular: entre más inmaduras (de tipo blástico) son agudas, mientras que las crónicas se caracterizan por células más maduras¹⁵⁸.

Las células de las leucemias agudas se caracterizan por ser incapaces de diferenciarse y tener un índice muy bajo de mortalidad frente a las células normales, pero a medida que se multiplican las van desplazando paulatinamente; y por éste mecanismo se presentan las características penias de las leucemias agudas⁸⁴.

Las primeras descripciones formales de las leucemias pueden atribuirse al inglés Bennet y al célebre patólogo alemán R. Virchow, quienes en forma independiente publicaron en 1845 los dos primeros casos de leucemia. Corresponde también el crédito de haber acuñado

el término de "leucemia" a Virchow. Así mismo, propuso la primera clasificación de las leucemias, refiriéndose sin saberlo, a las primeras formas crónicas de la enfermedad. En 1857, Friedreich identificó a la leucemia aguda (LA) como una entidad diferente a las descritas. En 1889, Epstein por su parte, y Fraenkel unos años más tarde, dividieron a la LA en dos variedades morfológica y clínicamente distintas, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia no linfocítica aguda o también denominada leucemia mielogénica aguda (LMA). No es, sin embargo, hasta los estudios de Ehrlich a fines del siglo pasado y de Naegli y Shilling a principios de nuestro siglo, cuando se establecen características morfológicas, tintoriales y clínicas que permitieron identificar con mayor precisión a las LA

58,84,139

8.2. FRECUENCIA

La incidencia global para todas las leucemias a nivel mundial suele ser de 9.8 nuevos casos por cada 100,000 habitantes, aunque existen zonas en donde ciertas variedades de leucemias son más frecuentes y afectan de manera diferente, de acuerdo a su tipo a niños y adultos ^{139,158}.

Las leucemias mieloblásticas son más frecuentes en adultos jóvenes y otro pico de incidencia después de los 50 años ¹⁵⁸.

La incidencia de leucemia mielomonocítica aguda M4 es de un 25 % del total de las leucemias mieloides agudas, mientras que la leucemia monocítica aguda M5 se encuentra en un 10 % ¹⁴.

8.3. ETIOLOGIA

La etiología de la leucemia aguda es desconocida en la mayoría de los casos. En casos especiales se han identificado factores patogénicos específicos ^{58,84,139,180}.

Factores genéticos

La leucemia congénita puede presentarse en neonatos y frecuentemente se asocia con anormalidades cromosómicas. La forma típica es la LMA y puede no requerir terapia. Se ha registrado un aumento en la frecuencia de LMA en la anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, síndrome de Down, síndrome de Klinefelter y la ataxia telangiectásia. Hay un incremento en la concordancia de LLA en los gemelos monocigotos ^{58,84,139,180,210}.

Radiación

Se ha encontrado un incremento en la frecuencia de todas las formas de leucemia en los sobrevivientes de la bomba atómica y en pacientes que reciben radioterapia por enfermedades como los linfomas y la espondilitis anquilosante, policitemia vera e hipertiroidismo. Por otro lado se ha reportado que los operarios de los equipos de rayos X, radiólogos o técnicos radiólogos tienen 2.5 veces más posibilidades de desarrollar leucemia que la población no expuesta ^{58,84,139,180,210}.

Virus

Es uno de los factores que en la actualidad tienen más relevancia, y que además ha permitido tener un campo de investigación. Se propone que los virus fundamentalmente aquellos que producen transcriptasa inversa, estimulan o activan un protooncogen, que puede estar encargado de la regulación del crecimiento y diferenciación de líneas celulares en forma apropiada (por mutación, rearrreglo genético u otras formas) y esto podría entonces conducir al desarrollo de LA ^{58,84,139,219}

Oncogenes

Los oncogenes son secuencias de DNA asociadas a tumores, los oncogenes celulares (c-onc) son en general particularmente homólogos al oncogen viral (v-onc) y son también referidos como protooncogenes, éstos son genes de células normales con un papel fisiológico en la regulación de proliferación y diferenciación, requieren activación para causar neoplasias. Los oncogenes asociados a retrovirus (v-onc) son casi todos híbridos de la región codificada de oncogenes celulares ligados a la región de codificación de genes esencialmente vírales ^{84,153,210}

Los oncogenes retrovirales pueden iniciar y mantener la proliferación de células malignas como resultado del aumento del producto del gene. Esto es referido como la hipótesis de una etapa; alternativamente el DNA y los virus de leucemia crónica no transforma a proliferantes directamente pero al parecer actúan por mecanismos indirectos, los cuales requieren que un proto-oncogen

que pueda operar como un iniciador del gen requiriendo de otro gen (viral o celular) en un proceso de multi-etapas ^{139,210}.

Proto- y oncogenes virales codifican para productos asociados con los factores de crecimiento de replicación celular, receptores, proteínas de la señal de transducción, etc., o pueden inducir independencia de requerimientos de factores de crecimiento. La translocación cromosómicas en malignidades hematopoyéticas están asociadas con el movimiento de oncogenes celulares y reubicación y posible rearrreglo con otros genes resultando en la expresión del gene alterado ^{84,139,210}.

Fármacos y compuestos químicos

Hay un incremento en la frecuencia de LMA después de la exposición al benceno, cloramfenicol, agentes alquilantes como la ciclofosfamida y el clorambucil, y otros fármacos y compuestos químicos ^{58,84,210}.

Trastornos hematológicos adquiridos

Se ha observado un aumento en la frecuencia de LMA en pacientes con anemia refractaria, anemia sideroblástica, trastornos mieloproliferativos (policitemia vera, mielofibrosis), mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, hemoglobinuria nocturna paroxística (HNP) y otras enfermedades ⁵⁸.

8.4. CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS (LMA) DE ACUERDO A LA ORGANIZACION FRANCO-AMERICANO-BRITANICO (FAB)

De acuerdo al criterio puramente morfológico las leucemias se clasifican como:

- Crónicas: cuando presentan menos del 30% de blastos en la médula ósea.
- Agudas: cuando presentan más del 30% de blastos en médula ósea ¹⁰.

En 1975 se formo el grupo FAB que propuso una forma universal para clasificar a la leucemia aguda con el fin de unificar criterios y determinar patrones de comportamiento evaluables en cualquier lugar. Esta clasificación se basa en la morfología y comportamiento citoquímico de las células blásticas sobre extensiones medulares hemáticas, y dependiendo de la célula comprometida las leucemias pueden ser de estirpe linfoide o mieloide ⁵⁸.

Inicialmente la FAB clasifico las leucemias mieloides agudas (LMA) en seis grupos (M1 a M6) y en 1985 integró a la M7. Posteriormente, en 1991 se añadió una última variedad, la leucemia aguda con mínima diferenciación mieloide ó M0. El diagnóstico de estas dos variedades requiere de la aplicación de técnicas inmunológicas, y de citoquímica ultraestructural (ver tabla 8.1) ^{14,180}.

M-0 Leucemia mieloblástica sin maduración citológica

Esta forma de LMA es indistinguible por criterios exclusivamente morfológicos y citoquímicos, y sólo la positividad de la mieloperoxidasa (MPO) a nivel ultraestructural (microscopía electrónica) y del inmunofenotipo mielóide para CD13 y/o CD33 (por inmunocitoquímica), así como la negatividad de los marcadores linfoides de la línea B y T, permiten definirlo ^{14, 180}.

Los blastos leucémicos son similares morfológicamente a los de la leucemia linfoblástica aguda, variedad L2 del FAB, y son constantemente mieloperoxidasa y negro sudán negativos. Esta variedad se encuentra asociada a pacientes de avanzada edad y además a una pobre respuesta a la terapia combinada; siendo esta de un peor pronóstico que en el resto de variedades FAB ^{14, 180}.

M-1 Leucemia mieloblástica indiferenciada

También denominada leucemia mieloblástica inmadura. Muestra una clara imagen de diferenciación granulocítica pero no así de maduración, por lo que puede confundirse con LLA con la microscopía de luz. Se caracteriza por presentar blastos carentes de gránulos, contiene generalmente de 2-5 nucléolos, los bastones de Auer son poco comunes, coexisten altos porcentajes de células inmaduras con escasas cantidades de granulocitos maduros.

Tanto en sangre periférica como en médula ósea las células son mieloblastos de núcleo redondo cromatina nuclear fina y homogénea, escaso citoplasma con bordes citoplásmicos bien definidos. La M-1 es

más común en adultos y la más frecuente en niños. El porcentaje de blastos es de 90% y 10% de polimorfonucleares granulocitos o monocitos ^{30,58,79,125}.

M-2 Leucemia mieloblástica diferenciada

También denominada como leucemia mieloblástica con maduración presenta una tendencia mayor a la maduración hacia la línea mieloide; por estas razones es posible encontrar blastos y promielocitos, es más común la presencia del bastones de Auer; se pueden identificar gránulos azurófilos escasos. La M-2 representa de un tercio a la mitad de los casos de LMA. Al igual que la M-1 la M-2 es frecuente en adultos y niños. El porcentaje de blastos es de 30-89%, 10% de promielocitos y un porcentaje variable de granulocitos ^{30,58,79,125}.

M-3 Leucemia promielocítica aguda

También denominada leucemia promielocítica hipergranular, existe un franco predominio de promielocitos anormales con hipergranulación. El núcleo varía grandemente en tamaño y forma y es frecuentemente reniforme o bilobulado. El citoplasma de muchas de las células está completamente ocupado por grandes gránulos unidos coloreados de rosa brillante, rojo o púrpura por tinción de Romanowsky. En algunas células el citoplasma está ocupado con gránulos finos semejante a polvo. Las células características que contienen a los cuerpos de Auer se encuentran distribuidos al azar en el citoplasma están casi invariablemente presentes en la médula ósea y algunas veces en sangre periférica. El citoplasma de las células que contienen cuerpos de Auer están usualmente teñidos de color pálido o

claro pero pueden también contener gránulos azurófilos. Hay una frecuencia alta de complicaciones de sangrado y de coagulación intravascular diseminada (CID) esta variante es la de peor diagnóstico precisamente por su complicación. La M-3 es usual en adultos. El porcentaje de promielocitos es de 30-89% y 10 % de blastos ^{30,125,139}.

M-4 Leucemia mielomonoblástica

Llamada también leucemia mielomonocítica. En esta entidad se encuentra tanto elementos inmaduros de la serie granulocítica y monocítica, en ocasiones es posible observar elementos mielomonocitoides, caracterizados por presentar núcleo de monoblasto y citoplasma de granulocito. Tanto en sangre periférica (S.P.) como en médula ósea (M.O.) es el monoblasto la célula que predomina, el cual posee un núcleo de aspecto "arriñonado", su cromatina es fina como la del mieloblasto, pero reticular, tiene una gran cantidad de citoplasma, comparándolo con el del mieloblasto, y los bordes citoplásmicos son irregulares, incluso son pseudópodos ^{14,58,84,125}.

M-5 Leucemia monoblástica pura

Denominada también leucemia monocítica. Las células tienen aspecto monocitoide son de gran tamaño, el número es irregular, y de aspecto "arriñonado", el citoplasma muy abundante, con bordes acerrados. Los cuerpos de Auer son raros. En la sangre periférica hay una gran cantidad de monocitos aparentemente maduros ^{14,58,125}.

M-6 Eritroleucemia

Conocida también como la enfermedad de Di Guglielmo. Los componentes eritropoyéticos usualmente exceden el 50% de todas las células nucleadas en la médula ósea y los eritroblastos muestran el grado variable, características morfológicas de bizarras, especialmente lobulación múltiples de los lóbulos, con variación en el tamaño de éstos, múltiples nucléolos, presencia de uno o más fragmentos nucleares, formas gigantes y rasgos megaloblásticos. Los eritroblastos están frecuentemente en la sangre ^{79,125}.

La proporción de blastos del tipo I y II pueden exceder el 30% de las células no eritroides restantes. Los cuerpos de Auer pueden ser vistos. Cuando el 50 % o más de todas las células nucleadas son eritroblastos y < que 30% de células no eritroides son blastos, el diagnóstico se vuelve SMD. Los progenitores eritroides pueden ser PAS positivos ^{58,79}.

M-7 Leucemia megacarioblástica

La médula ósea es usualmente fibrosa y no permite ser aspirada. La tinción de la biopsia de la médula ósea con reticulina y colorantes tricrómicos pueden demostrar una fibrosis de reticulina y de colágeno, y una osteosclerosis. Las células son mieloperoxidasas negativas, pueden teñirse para la peroxidasa plaquetaria. Su identificación depende del uso de marcadores inmunológicos para megacariocitos. El pronóstico con quimioterapia convencional es muy malo. El trasplante homólogo de médula ósea puede ser curativo e incluso es capaz de invertir la mielofibrosis intensa y la osteosclerosis. La

demostración inmunológica de las glucoproteínas de membrana Ib y Iib/3a específicas de plaquetas utilizando anticuerpos monoclonales pueden establecer la identidad de megacarioblastos y su número ^{6,174}.

Tabla 8.1 Clasificación FAB de la leucemia mielogénica aguda ^{30,58}.

Subtipo	Terminología común	Línea Celular predominante	
M-0	Mieloblástica sin maduración citológica LMA	Mieloide	
M-1	Leucemia Mieloblástica indiferenciada LMA	Mieloide	Más frecuente en niños
M-2	Leucemia Mieloblástica con maduración LMA	Mieloide	Más frecuente en niños
M-3	Leucemia promielocítica aguda APL	Mieloide	Usualmente en adultos
M3 variante	APL hipogranular		
M-4	Leucemia Mielomonoblástica AMML	Mieloide y monocítica	
M4eo-	M4 con maduración eosinofílica.		
M4baso	M4 con maduración basofílica.		
M-5	Leucemia Monoblástica Pura AMoL	Monocitos	Usualmente en niños y jóvenes
M5 _A	LMA poco diferenciada		
M5 _B	LMA más diferenciada		

Subtipo	Terminología común	Línea Celular predominante	
M-6	Leucemia eritroide aguda AEL	Eritrocitos y Mieloide	VCG
M-7	Leucemia Megacarioblástica	Megacarioblástica	CGH

8.5. CLASIFICACION MORFOLOGICA, INMUNOLOGICA Y CITOGENETICA

CLASIFICACION MIC.

La inmunología y la citogenética han proporcionado una valiosísima información en el terreno diagnóstico y pronóstico de las leucemias agudas. Un esfuerzo conjunto de especialistas de todas estas disciplinas han culminado en una nueva clasificación denominada MIC, puesto que tiene en cuenta datos morfológicos, inmunológicos y citogenéticos, y gracias a la cual se perfilan nuevas subvariedades de interés clínico-pronóstico (ver tabla 8.2).

La caracterización inmunofenotípica se lleva a cabo mediante una batería de anticuerpos monoclonales; algunos de éstos reaccionan específicamente con una línea celular determinada e, incluso para un estadio madurativo determinado; otros no tan específicos proporcionan una valiosa contribución diagnóstica y pronóstica al delimitar nuevas variantes y reconocer leucemias con marcadores linfoides y mieloides. En la tabla 8.3 se resumen los Anticuerpos Monoclonales utilizados en el fenotipo de una leucemia aguda¹⁸⁰.

La citogenética ofrece una valiosa información desde el punto de vista etiológico, pronóstico y, probablemente terapéutico. La nomenclatura MIC recoge esta información y consigna el tipo morfológico FAB seguido del signo barra (/) y la anomalía cromosómica específica entre paréntesis [Ejemplo: M2/t(8;21)]. En el análisis citogenético se prefiere el estudio de la médula ósea al de la sangre periférica; se utilizan cultivos cortos; de 24 a 48 horas, e identificación cromosómica con técnica de bandeado, y debe examinarse un número suficiente de metafases (de 20 a 30) ¹⁸⁰.

Tabla 8.2 Clasificación MIC de Leucemias Agudas Mieloblásticas ¹⁸⁰.

Asociación morfológica-cariotipo

Cariotipo	Frecuencia (%)	FAB*	Nomenclatura MIC
t(8;21)(q22;q22)	12	M2	M2/t(8;21)
t(15;17)(q22;q12)	10	M3,M3v	M3/t(15;17)
t/del(11)(q23)	6	M5a(M5b;M4)	M5a/t(11q)
inv/del(16)(q22)	5	M4Eo	M4Eo/inv(16)
t(9;22)(q34;q11)	3	M1(M2)	M1/t(9;22)
t(6;9)(p21-22;q34)	1	M2 o M4basófila	M2/t(6;9)
inv(3)(q21;q26)	1	M1(M2,M4,M7) con trombocitosis	M1/inv(3)
t(8;16)(p11;p13)	< 0.1	M5b con fagocitosis	M5b/t(8;16)
t/del(12)(p11-13)	< 0.1	M2 con basofilia	M2baso/t(12p)
+4	< 0.1	M4(M2)	M4/+4

Tabla 8.3 Anticuerpos monoclonales (CD) utilizados en el estudio fenotípico de la Leucemia Aguda.⁷⁵

CD	Estirpe-asociado
CD2	T(receptor E)
CD3	T
CD7	T
CD10	B(cALLa)
CD11b	Mieloide/monocítico
CD13	Mieloide
CD14	Monocítico/Mieloide
CD19	B
CD22	B
CD25	Receptor Interleucina-2 (cadena β)
CD33	Mieloide
CD34	Célula progenitora multipotente
CD41	Megacariocítico, glucoproteína IIb/IIIa
CD42	Megacariocítico, glucoproteína Ib
CD45	Antígeno leucocitario común
CD61	Megacariocítico, glucoproteína IIIa
CD68	Monocítico

El objetivo de este trabajo es estudiar las LMA y en particular los tipos M4 y M5 según la clasificación FAB; ya que son las que presentan una alteración en la línea granulomonocítica, es decir en la célula progenitora bipotencial CFU-GM.

8.6. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS

En general los diferentes tipos de leucemia aguda son bastante similares en algunos de los hallazgos del laboratorio, hematológicos, y otros; para poder considerarlos primero como grupo y analizarlos después como formas individuales. No obstante, una historia clínica cuidadosa, la exploración física, el examen de sangre periférica y, fundamentalmente, del aspirado de médula ósea y una biopsia medular en determinados casos, proporcionan el diagnóstico de leucemia aguda.

En estudios por biopsia es de gran valor detectar el grado de celularidad y la presencia y magnitud de reemplazamientos de células normales por células neoplásicas. Además, los grados de fibrosis e infiltración de grasas son consideraciones muy importantes⁵⁸.

El diagnóstico se basa en la observación de una blastosis medular que iguale o supere el 30% de la totalidad celular, ya que el hallazgo de algunas células blásticas, tanto en médula ósea como sangre periférica, no indica necesariamente la existencia de leucemia aguda.

Para seguir las nuevas directrices de la FAB se requiere de dos recuentos medulares; uno basado en el total de células nucleadas para determinar el tanto por ciento de células eritroides y otro referido al número de células blásticas sobre el total de células no eritroides. Así, si hay menos de 50% de precursores rojos sobre el total de células medulares y un 30% o más de células blásticas, también sobre el total celular, se diagnostica leucemia mieloblástica aguda, variedades M1-M5 y M7, y estas dependen del grado de maduración celular. En caso de tener un eritroblastosis igual o mayor al 50%, la cifra de blastos calculada sobre el total de células no eritroides iguale o supere al 30% se establece el diagnóstico de variedad M6 ó eritroleucemia^{14,75,180}.

El estudio morfológico óptico, citoquímico, ultraestructural, inmunológico y citogenético detallado es fundamental para etiquetar el tipo de leucemia aguda.

El diagnóstico diferencial debe establecerse con diversas entidades. Desde el punto de vista morfológico, la mayor posibilidad de confusión se presenta frente a la mononucleosis infecciosa u otras reacciones leucemoides linfotóxicas. La serología vírica y la evolución clínica ayudan a aclarar el diagnóstico. Las metástasis medulares masivas del neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, o del cáncer anaplásico de pulmón, entre otros, pueden dar una imagen de leucemia aguda. Las localizaciones medulares de linfomas centrolímbicos de células no hendidas y citoplasma basófilo pueden

crear problemas diferenciales con las leucemias monoblásticas agudas^{75,180}.

Así mismo, la forma de poder diferenciar un síndrome mielodisplásico con exceso de blastos o en transformación de una leucemia aguda se establece por la presencia de signos dishemopoyéticos intensos, promielocitosis y promonocitosis. En las LMA se precisa que más del 30% de las células sean blásticas para diferenciarla de los síndromes mielodisplásicos¹⁸⁰.

Datos hematológicos en sangre periférica:

Los hallazgos hematológicos se relacionan con la infiltración leucémica de la médula ósea que lleva a anemia, leucopenia, y trombocitopenia, y con la liberación de células leucémicas a la sangre periférica.

Todas las formas de leucemia aguda se acompañan de una anemia normocítica normocrómica, que incluso en sus primeras etapas deprime la concentración de hemoglobina a 6-10 g/dl. No hay cambios morfológicos característicos. El nivel de reticulocitos puede ser normal, bajo o mínimamente elevado en respuesta a la hemorragia^{125,180}.

CAPITULO 9

LEUCEMIA NO LINFOCITICA AGUDA CON ALTERACION DE LA LINEA GRANULOMONOCITICA (G/M) PRINCIPALMENTE

9.1. CUADRO CLINICO DE LEUCEMIA

MIELOMONOCITICA (M 4) Y MONOCITICA (M5)

En términos generales el cuadro clínico de las leucemias agudas es similar para todas las formas citológicas con algunas variaciones especiales de algunas de ellas.

Los datos clínicos frecuentes al inicio de la enfermedad son: fiebre alta, postración, cefalea, malestar general, etc.. En la exploración física los hallazgos más frecuentes son: palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, adenopatías y púrpura. Las hemartrosis y la epistaxis no son frecuentes como síntoma de leucemia aguda. La hemorragia post-amigdalectomía y post-exodoncia es la primera manifestación hemorrágica de una leucemia aguda. Las hemorragias gastrointestinales, genitourinarias, del sistema nervioso central y las metrorragias se presentan con relativa frecuencia durante el curso de la enfermedad. Las hemorragias del conducto auditivo y del fondo de ojo son frecuentes y causan vértigo y ceguera parcial o total, hay una relación directa entre la intensidad de los signos hemorrágicos y la presencia de fiebre.

Las manifestaciones infecciosas se presentan con mayor frecuencia a nivel de cavidad oral y garganta. Puede presentar úlceras de la mucosa oral, la faringe y el tracto respiratorio superior^{54,75}

En el estudio clínico pueden presentarse signos morfológicos de mielodisplasia que afecta simultáneamente a las líneas eritroides, granulocítica y megacariocítica; se observa en el 12-15% de leucemias agudas *de novo*. Los pacientes con morfología mielodisplásica son ubicados, con mayor frecuencia, en la variedad M6, M7 y M4 y prácticamente nunca en la variedad M3.

En las LMA, las adenopatías sólo suelen apreciarse en los subtipos con componente monoblástico (M4 y M5) y también en estos subtipos son características la hiperplasia gingival y tumoraciones óseas o en la piel, así como una mayor frecuencia de infiltración del SNC en la que se observa disfunción de los nervios craneales, y debe sospecharse cuando la exploración física muestra edema papilar, parálisis de los nervios craneales o signos de meningitis en comparación con los restantes tipos de leucemias mieloides^{54,75}.

Las coagulopatías relacionadas con la liberación de productos de ruptura de las células leucémicas son complicaciones graves que pueden estar progresando en el momento del inicio del proceso o bien presentarse durante el tratamiento de inducción. La coagulación intravascular diseminada (CID) aparece más a menudo en asociación con una LMA M3, pero también se observa en la LMA M4 y M5, y menos frecuentemente en asociación con otras leucemias agudas.

Las coagulopatías se asocian igualmente con infecciones sistémicas o con deficiencias de factores en el inicio de la enfermedad y pueden contribuir a empeorar los efectos de la trombocitopenia ^{125,180,208}.

En 1983 se describió una variedad de leucemia mielomocítica aguda, que cursa con eosinofilia medular atípica y anomalías cromosómicas en el par 16, la cual se denomina variedad M4 con eosinofilia. Representa el 5-6% de las LMA y el 20% de las M4 clínicamente se distingue por alto número de remisión completa y aparente mayor duración de la remisión y supervivencia que la M4 sin anomalías del cromosoma 16, y se le considera una LMA de buen pronóstico. No obstante, en esta subvariedad se observan en ocasiones recaídas en el sistema nervioso central, en forma de afección leptomenígea y mieloblastomas intracerebrales.

La M5 clínicamente predomina en adultos de más de 40 años y en niños menores de 2 años. Existe una forma asociada con el nacimiento que afecta frecuentemente a la piel y que, en ocasiones, presenta una remisión espontánea transitoria.

Probablemente relacionada con las propiedades físicas de adhesividad, deformabilidad y movilidad de los monoblastos leucémicos, la frecuente participación extramedular se explica en el diagnóstico de las recaídas. Los tejidos y los órganos más afectados son piel, SNC, encías, ganglios, hígado, bazo y pulmones. Hasta un 7% de los pacientes puede presentar infiltración meníngea al diagnóstico ¹⁸⁰.

9.1.2. PRUEBAS DE LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO DE LEUCEMIA MIELOMONOCITICA (M4) Y MONOCITICA (M5)

Hallazgos Hematológicos. En el examen morfológico debe ponerse especial atención a las características del núcleo: su grado de inmadurez determinado por la finura de la cromatina, la presencia o no de nucléolos y la forma y contorno del mismo núcleo ^{14,125}.

La naturaleza de las inclusiones citoplásmicas particularmente gránulos primarios o secundarios, granulación azurófila, vacuolas y cuerpos de Auer, son puntos claves en el diagnóstico. Igualmente, la proporción de citoplasma basofílico es importante para juzgar el grado de inmadurez; un citoplasma abundante que no es azul es un rasgo característico de mayor madurez ¹⁷⁷. Si la leucemia es de predominio monocítico o mielomonocítico, las células leucémicas tienen típico aspecto monocítico con núcleos deprimidos, plegados, de forma irregular con cromatina fina y 3-5 nucléolos. El reborde citoplasmático bastante ancho, contiene vacuolas y gránulos citoplasmáticos que pueden fusionarse formando *cuerpos de Auer* ¹⁵⁸.

El diagnóstico de M-4 y separación de M-2 y M-5 requiere de la evaluación de sangre periférica y médula ósea. En médula, los blastos son > al 30% de las células no eritroides. La suma de mieloblastos, promielocitos, mielocitos y granulocitos tardíos es 30% ó más pero menos del 80% de células no eritroides. Más del 20% de las células no eritroides son de la línea monocítica en diferentes estados de maduración; usualmente ellos son promonocitos y monocitos. Cuando

las células monocíticas exceden el 80% el diagnóstico es M-5 (leucemia monocítica). Cuando la MO presenta las características arriba señaladas y la cuenta de monocitos en sangre es $5 \times 10^9/l$ ó más, el diagnóstico es M-4, se establece si más del 20% de precursores de la MO son monocitos como se muestra en reacciones citoquímicas o si la concentración de lisosima excede tres veces el valor de referencia del laboratorio. (ver fig 9.1a) ^{75,177,180}.

Un pequeño porcentaje de casos con M-4, los eosinófilos que están presentes en la médula ósea, usualmente suman un 5% o más de células no eritroides ^{14,75,125,177,180}.

En la M-4eo los eosinófilos contienen gránulos grandes, irregulares y de inclinación tintoral basófila, mezclados con gránulos normales. El núcleo es de aspecto monocítico (no segmentado). Los gránulos eosinófilos son, a diferencia de los normales, cloroacetato esterasa y PAS positivos. Como poseen apetencia tintoral basófila, para diferenciarlos de la auténtica granulación basófila se impone la demostración de la negatividad de la enzima omega-exonucleasa que solo es positiva en la serie basófila-mastocítica. Aunque raro, las células con estas características pueden ser identificados en pacientes con M2, pero en la mayoría de estos casos de M2 con eosinófilos carecen de gránulos anormales observados en M4 con eosinofilia (fig 9.1b). El examen ultraestructural de los eosinófilos muestra importantes anomalías ^{14,75,177,180}.

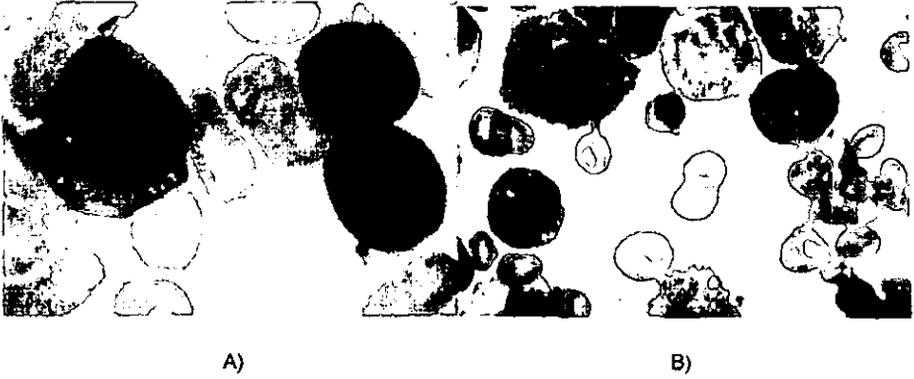


Fig. 9.1 A) Leucemia aguda mieloblástica M4; y B) Leucemia aguda mieloblástica M4EO

El diagnóstico de M-5 esta basado en la apariencia de la médula ósea. Un criterio suficiente: 80% ó más de células no eritroides son monoblastos, promonocitos o monocitos. Dos subtipos son reconocidos: diferenciados pobremente o monoblastos (M-5a) y los diferenciados o monocíticos (M-5b) ^{14,177}.

Para M-5a un 80% o más de las células monocíticas son monoblastos. Las células tienen un delicado hilo de cromatina, y ocasionalmente arriba de tres nucléolos vesiculares prominentes. El citoplasma es voluminoso, a menudo muestra uno más pseudópodos, es basofílico y puede contener raramente gránulos azurófilos. La pseudopodía puede ser más translúcida que el resto del citoplasma dando la apariencia de una doble membrana ^{177,180}.

M-5b menos de 80% de las células monocíticas son monoblastos los restantes serian promonocitos y monocitos pero la proporción de monocitos en la sangre es más alta que en la MO. Estas células son similares a los monoblastos pero tienen un gran núcleo con una apariencia cerebriforme; (fig. 9.2) el nucléolo puede estar presente pero el citoplasma es menos basofílico, tienen una apariencia de cristales de tierra gris y finos gránulos azurofílicos esparcidos por todos lados ^{78,177,180}.

En ambos tipos pocas células pueden contener bastones de Auer. El diagnóstico puede confirmarse por la reacción de la esterase no específica ^{14,75,125,180}.

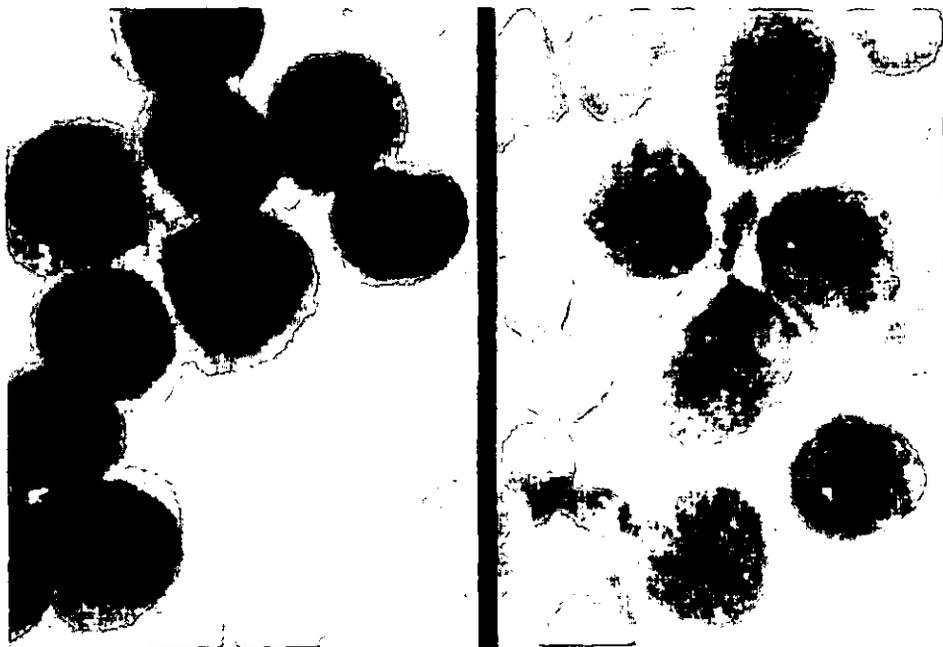


Fig. 9.2 Leucemia aguda mieloblástica TM5a y M5b

9.1.2.1. Métodos citoquímicos

La citoquímica -el complemento más antiguo de la citología convencional- estudia la composición química de la célula y permite precisar la localización topográfica de diversas sustancias, considerándose como un nexo de unión entre la morfología y bioquímica, al conjugar forma y función. Mediante técnicas citoquímicas puede ponerse de manifiesto en lo que a células se refiere diversos principios inmediatos, enzimas oxidantes o hidrolíticas y compuestos inorgánicos entre otros ^{166,180}.

La reacción enzimática de las oxidasas es una prueba insustituible en la diferenciación entre células mieloides y linfoides ^{14,198}.

La positividad de la mieloperoxidasa a nivel óptico en la granulación primaria o a nivel electrónico, en su ubicación en la cisterna perinuclear y reticuloendoplasmático rugoso, es hoy por hoy el mejor marcador mieloides. El interés en su estudio no se limita sólo a la filiación blástica, sino que la constatación de un déficit total o parcial en la mieloperoxidasa en una célula granulopoyética semimadura o madura apunta a su pertenencia a una clona mieloides patológica, permitiendo diferenciar hemopatías primarias de reacciones neutrofílicas secundarias ^{14,180,198}.

Las estereasas inespecíficas (naftol-AS-D-acetato, naftolacetato, naftilbutirato esterasas son otros de los clásicos en la identificación celular, su positividad y fluorosensibilidad se constata en las

leucemias monocíticas tanto agudas como crónicas y dicha técnica debe de aplicarse siempre que interese resaltar el componente monocítico de una población celular ^{166,180,211}.

En las leucemias mielomonocíticas y monocíticas las reacciones de peroxidasa, negro de Sudán B y naftol AS-D cloroacetato esterasa son negativas, y la actividad de α -naftol AS-D acetato esterasa es fuertemente positiva, pero inhibida por el fluoruro de sodio, reacción que es diagnóstica de los monocitos, ya que la α -naftol AS-D acetato esterasa granulocítica no se inhibe con NaF ^{14,198}. (En la tabla 9.1 se detallan las pruebas citoquímicas más características de las diferentes variedades de leucemias mieloblásticas aceptadas por el grupo FAB).

Valores siempre elevados de lisozima se han hallado en el suero y orina de pacientes con leucemia aguda mielomonocítica y monocítica ³¹³. La elevación de la lisozima urinaria es responsable de una reacción positiva de proteína urinaria y de una peculiar disfunción glomerulotubular. La elevación de lisozima sérica da lugar a un pico γ monoclonal en el electroforetograma sérico ^{75,180,198}.

Tabla 9.1 Comportamiento citoquímico de las leucemias agudas mieloides ^{75,180}

Reacciones citoquímicas	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Mieloperoxidasa/ Negro Sudán B	+	++	++	++	-/+	+	-
						(en células mieloides)	
ANA-esterasa	-	-	-	+/- (sensible NaF)	++	-	+
Fosfatasa ácida	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	+
PAS	+/-	+	+	+	+	++	+
		(difusa)	(difusa)	(difusa y/o granular)	(difusa y o granular)	(en eritroblastos)	

ANA = α -nail acetato; PAS= acido periodico de Schiff

9.1.2.2. Inmunofenotipificación en el diagnóstico de LMA

Cuando no existe estigmas seguros de diferenciación mieloides como bastones de Auer, astillas o granulación azurófila mieloperoxidasa positiva, conviene proceder a la inmunofenotipificación celular. El análisis inmunofenotípico tiene como objetivo no el detectar la leucemia aguda, sino el asignar el linaje a la proliferación blástica ya establecida. Ciertas combinaciones de anticuerpos pueden definir inmunofenotipos "únicos" que pueden ser de utilidad en la detección de enfermedad mínima residual al distinguir poblaciones normales de

precursores hematopoyéticos y proliferaciones leucémicas de baja frecuencia. Es aconsejable realizar el estudio con al menos dos anticuerpos monoclonales (AcMo) representativos de cada línea celular hematopoyética, lo que permite la tipificación en la mayoría de los casos ^{136,206}.

Los antígenos de superficie de los leucocitos se pueden clasificar por sus reacciones con grupos de AcMo en varios «grupos de diferenciación» (CD: del inglés «Clusters of Differentiation»). Se conocen 78 CD que agrupan a AcMo de características similares y/o idénticas y se hallan definidos por un número un grupo o CD. Un grupo o CD puede incluir una serie de AcMo que detectan diferentes epítomos de una molécula y, por tanto sus propiedades funcionales, bioquímicas y su reactividad con las células hematopoyéticas pueden no ser idénticas ^{86,136,180}.

La inmunofenotipificación se realiza mediante la inmunocitología, la cual plantea como objetivo la detección, identificación y localización de diversos componentes celulares mediante el reconocimiento de la reacción entre estos y los anticuerpos policlonales o monoclonales correspondientes, formándose un complejo antígeno-anticuerpo en el lugar de la reacción: La detección de antígenos inicialmente se realizó por técnicas de inmunofluorescencia indirecta a nivel de microscopía de fluorescencia y posteriormente por inmunocitoquímica, (inmunoperoxidasa o inmunofosfatasa alcalina- FAAFA-) sobre células fijadas ^{136,166}.

En los últimos años, la citometría de flujo (CMF) ha adquirido gran difusión debido fundamentalmente a su rapidez, objetividad y facilidad para emplear dobles y triples marcajes directos, incluida la detección de antígenos citoplasmáticos. En este sentido, no se debe olvidar que, en células hematopoyéticas precursoras, los antígenos primero aparecen en el citoplasma y luego en la membrana (ejemplo: CD22 en linfocitos B, CD3 en linfocitos T y CD13 en células mieloides) 136,177,180,213,231

La CMF estudia cada una de las células presentes en la muestra, las cuales son transportadas por el fluido para ser iluminadas por un rayo láser, obteniéndose un análisis multiparamétrico de las propiedades físicas y biológicas celulares. El AcMo unido al antígeno de membrana, marcado con fluorocromo se manifiesta al ser excitado permitiendo clasificar cada célula de acuerdo a la dispersión de la luz y la emisión de la fluorescencia ^{14,47}.

En las LMA el estudio inmunofenotípico tienen aparentemente, menor utilidad que las LAL. Los primeros antígenos en detectarse en la diferenciación hematopoyética mieloide normal son CD33 y CD13. La utilidad de los AcMo en el diagnóstico de las LMA se centran en las M7 y M0 (indiferenciadas) y quizá también en el variante microgranular de la leucemia promielocítica (HLA DR-) que, morfológicamente, puede plantear problemas diagnósticos con la M4 (HLA DR+), así como para distinguir la M5 de algunos linfomas leucemizados con los que puede presentarse confusión. La diferenciación monocitoide la M4 y la M5 a menudo expresan CD14 y

CD11 en la tabla 9.2 se resume la relación entre la morfología FAB y los marcadores de membrana en LMA ^{175,177,180}.

Tabla 9.2 Asociación entre marcadores de membrana-clasificación FAB²⁵.

Anticuerpos	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
HLA-DR	+	+	-	+	+	+/-	+/-
CD34	+	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-
CD33	+	+	+	+	+	+/-	+/-
CD13	+/-	+	+	+	+	-	+/-
CD11	-	+	+/-	+	+	-	?
CD15	-	+	+/-	+	+	+/-	+/-
CD14	-	+/-	-	+	+	-	+/-
Glucoforina A	-	-	-	-	-	+	-
CD41	-	-	-	-	-	-	+

9.1.2.3. Hallazgos afines de laboratorio

Rara vez las células leucémicas sintetizan excesiva IgG, que lleva a *paraproteinemia* y *proteinuria de Bence Jones*.

La exploración del Líquido Cefalorraquídeo LCR es una parte importante de la valoración del paciente con leucemia aguda. Cuando sea posible se realiza una punción lumbar después de la correlación de la trombocitopenia, pues la punción se asocia en ocasiones con la formación de un hematoma. Este hematoma puede causar una compresión de la médula espinal y hacer necesaria la descompresión neuroquirúrgica. El LCR se analiza para determinar la presencia de

células anormales. Una glucosa baja, unas proteínas altas, o ambas a la vez, en el LCR puede acompañarse de leucemia o de infección. Se realizan cultivos microbiológicos para identificar algún agente infeccioso ⁸¹.

Se realiza un *perfil químico completo de la sangre*. La ruptura de las células leucémicas puede causar la liberación de ácido úrico, aniones orgánicos y otros productos metabólicos que provocan hiperuricemia, hipomagnesemia e hipocalcemia. También se observa una hipercalcemia sintomática. La elevación de urea en sangre o de la creatinina sérica pueden señalar una insuficiencia renal aguda que raramente aparece en la nefropatía debido al ácido úrico.

Debido a los problemas de coagulación intravascular diseminada en las variantes M3, M4 y M5 en el momento de la presentación es necesario realizar pruebas de función de la coagulación dado que pueden estar afectados el tiempo de trombina entre otros ⁸¹.

9.1.2.4. Estudios Citogenéticos en el diagnóstico de M4 y M5

La investigación en el área de la genética orientada al estudio de las neoplasias, ha permitido grandes avances en el entendimiento del fenómeno de la transformación maligna al descubrir alteraciones cromosómicas útiles en el diagnóstico y pronóstico de las entidades neoplásicas ^{48,177,180}.

En las leucemias se han encontrado alteraciones correspondientes al número y a la estructura cromosómica. Para el estudio de estos cambios sabemos que una clona es una población celular que se ha derivado de una simple célula progenitora. Se infiere este origen clonal cuando las células tienen la misma o muy similar anomalía cromosómica. Cuando la aberración implica la pérdida de un cromosoma, este cambio debe estar presente por lo menos en tres metafases ^{177,180}.

El número modal es el número cromosómico con mayor frecuencia en la población de células leucémicas y la línea o estirpe celular es la constitución cromosómica más frecuente, teniendo en cuenta tanto alteraciones estructurales como numéricas. Cualquier variación de la clona principal es una sublínea.

Con técnicas habituales de bandas, cerca de 50% de los pacientes con LMA presentan alteraciones cromosómicas identificables. El porcentaje aumenta a cerca del 100% si se utilizan técnicas de alta resolución cromosómica o técnicas de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) ^{71,177,180}.

Las alteraciones cromosómicas más frecuentes de las M4, M5 son: la t(8,16) (p11;p13). Su frecuencia se cifra en el 0.4% de las LMA, incide por igual en todas las edades y se advierte sobre todo en leucemias de *novo* ³⁰⁹. En la M4 la alteración cariotípica siempre involucra el brazo largo del cromosoma 16 (16q;22) y se constata como anomalía más frecuente la inv (16), seguida de la t (16;16). En M5 citogenéticamente se detectan anomalías del 11q en el 35% de las

M5 (más frecuentes en las M5a), un 10% presenta t(9;11), anomalía que transloca el oncogen c-ets-1 a la región del gen del alfa interferón en el cromosoma 9. En la tabla 9.3 se describen las alteraciones específicas tanto de M4 como M5 ^{109,113,120,177,180,206}.

Tabla 9.3 Asociaciones citogenéticas específicas de M4 y M5¹⁰⁰.

	Anomalía cromosómica	% de pacientes
M4eo	inv(16) (p13;q22)/t(16;16) (p13;p22)	90-100%
M5,M4	t(9;11) (q22;23) del(11) (q23) t(10;11) (p11-p15;q23) t(11;17) (q23;q25) t(11;19) (q23;p13) t(11q13; q23), del (11) (q23) t(1;11) (q21;q23) t(2;11) (q21;q23) t(6;11) (q27;q23) inv(10;11) (p11;q23q24)	

Las alteraciones citogenéticas se correlacionan con la duración de la remisión y con la supervivencia de los pacientes y se ampliarán en la presentación, las consecuencias de los rearrreglos cromosómicos con las modificaciones a nivel molecular de los oncogenes, los genes homeóticos, el receptor del ácido retinoico, los receptores de las células T, las interleucinas, los interferones, y los genes de las

cadenas pesadas y las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas
75,177,180,206

Así mismo, con las técnicas citogenéticas se pueden establecer valores de referencia de la cinética de proliferación celular, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátides hermanas (ICH), que son parámetros útiles en la investigación de los mecanismos de control del crecimiento y envejecimiento; en el estudio del efecto citotóxico, citostático y clastogénico de drogas antineoplásicas, y de fármacos y de otros agentes físicos químicos y biológicos ^{177,180}

9.1.2.5. Biología molecular en el diagnóstico de leucemias

La necesidad de implementar técnicas rápidas, exactas y reproducibles, se ha presentado en el área de la biología molecular (reacción en cadena de la polimerasa (PCR)), ya que ha revolucionado la comprensión de la transformación maligna y de la patogénesis del cáncer. A su vez el estudio de la transformación maligna ha permitido conocer los procesos moleculares y genéticos que gobiernan el crecimiento y la proliferación de las células normales. Por un lado, la existencia de aberraciones moleculares selectivas y específicas y, por otro, el desarrollo de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos abrieron el campo al diagnóstico molecular en el manejo del paciente. La caracterización de las alteraciones moleculares presentes en la muestra, además de apoyar al médico en la identificación del tipo o subtipo tumoral, ofrece

también un marcador que identifica a las células de la neoplasia, lo que permite el seguimiento y la vigilancia del paciente durante y después del tratamiento ^{45,177,179,180}.

9.2. TRATAMIENTO

9.2.1. QUIMIOTERAPIA

El tratamiento de las leucemias agudas se encamina a lograr la "remisión completa" en una primera fase de inducción. Se utilizan agentes quimioterápicos que se denominan ciclos. La remisión completa (RC) es un control de la enfermedad; definida como la reducción de células leucémicas a niveles no detectables; normalización de la función de la médula ósea completa y de los parámetros de la biometría hemática (cifras de hemoglobina, granulocitos y plaquetas); desaparición de las organomegalias y recuperación del estado clínico normal. La valoración objetiva de este logro se realiza mediante el examen de médula ósea o sangre periférica. Esta no indica de forma precisa la cantidad de leucemia residual y es un término utilizado cuando la presencia de blastos en médula ósea es inferior al 5%. Se ha calculado que en la RC el número inicial de células leucémicas estimado en 10^{12} , se reduce 2 logaritmos, es decir, a 10^{10} . La remisión completa traduce, por lo tanto, si no se especifica lo contrario, una valoración citomorfológica de la carga leucémica residual. Probablemente, y en un futuro inmediato, deberá especificarse si esta remisión es morfológica, citogenética o, incluso molecular ^{153,180}.

En el tratamiento de LAM los esquemas actuales, incluyen básicamente la combinación de una antraciclina (Daunorubicina, Doxorubicina ó Idarubicina) y Arabinósido de Citosina (ARA-C), mejor conocido como el esquema del "7 + 3", es decir administración por 7 días con ARA-C y 3 días con Daunorubicina, cerca del 65% de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda logran la ansiada remisión completa después de 1 a 2 ciclos de tratamiento. El Etoposide también a sido utilizado para inducir la RC en pacientes con LANL en un 25% ^{16,54,95,105,115,158,180,181}.

La siguiente etapa de manejo, una vez alcanzada la remisión completa corresponde a la postremisión, donde puede administrarse de acuerdo a la variedad de leucemia la respuesta inicial y la edad del paciente ^{158,180}.

Terapia de mantenimiento. Con dosis bajas de quimioterápicos mantener secuencia sin ocasionar mielosupresión, al menos excesiva por periodos variables de 1 a 3 años ¹⁵⁸

Terapia de consolidación. Han mostrado ser efectivos. Pueden efectuarse mediante la administración de nuevos tratamientos (entre uno o tres) iguales o similares al de inducción, generalmente más cortos ^{158,180}.

Terapia de intensificación consisten: en administrar ARA-C a altas dosis durante periodos cortos, durante 4 días asociado con otro citostático (p.ej. mitoxantrona) ^{105,115,232,237}.

Tratamiento posconsolidación. Según el criterio más extendido, el mejor tratamiento para prevenir la aparición de recidivas es el Transplante de Médula Osea (TMO). Entre un 60 y 65 % de los pacientes menores de 18 años sometidos a TMO en primera remisión puede ser mantenida durante 5 años. Las recidivas son escasas pasados dos años después del TMO. El principal problema radica en que sólo un tercio de los pacientes disponen de un donante de médula adecuado y en la alta morbilidad y mortalidad (entre un 15 y 20 %) derivadas de las complicaciones de esta técnica (enfermedad injerto-contra-huésped, neumopatía intersticial, infecciones y enfermedad venooclusiva, entre otras) ^{158,177,180}.

Más adelante se revisan con mayor detalle las características y aplicaciones de los Transplantes de Médula Osea .

Tratamiento sobre el Sistema Nervioso Central. El riesgo de recidivas en SNC es mayor en los tipos M4 y M5 y en las formas con hiperleucocitosis. Sin embargo, la mayoría de los protocolos consideran que debe aplicarse un tratamiento preventivo en todos los pacientes. Por lo general se utiliza quimioterapia intratecal con metotrexano y ARA-C en un total de 5 a 6 dosis. Este tratamiento se completa con el administrado por vía sistémica en los casos en los que se utilizan dosis altas de ARA-C por vía intravenosa. En los pacientes sometidos a TMO en que se administre irradiación corporal total, ésta también contribuye a prevenir la residiva en SNC ^{144,180}.

Tratamiento de las residivas. En los pacientes sometidos a quimioterapia y que presentan una residiva debe intentarse obtener una segunda remisión mediante asociaciones de ARA-C a altas dosis con mitoxantrona y en caso de que se consiga debe practicarse un TMO alogénico si se dispone de un donante adecuado. En su defecto, debería realizarse un TMO autólogo ^{180,237}.

9.2.2. USO TERAPEÚTICO DE LOS FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS HEMATOPOYÉTICAS

El uso de CSF en LMA, es controversial. Sus efectos son : acortan el periodo de neutropenia, inducen a las células hematopoyéticas a entrar a fases S del ciclo celular, llevan a diferenciación de la célula leucémica, interrumpen el efecto autócrino/parácrino y aumenta la función antimicrobiana. Los principales estudios de los CSF entre 1990 y 1996 indican que tienen varios usos en el tratamiento de LMA. La información sugiere que la utilidad de los CSF en la práctica clínica puede ser no sólo la reducción del período de neutropenia, sino el efecto antifúngico de las citocinas ^{27,73,74,77,132,177,181}.

CAPÍTULO 10

TECNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE MEDULA OSEA Y SANGRE PERIFERICA

10.1. IMPORTANCIA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Entre las células hematopoyéticas, las correspondientes a los estadios más diferenciados de la hematopoyesis son reconocibles con el microscopio, mientras que las células progenitoras inmaduras no son reconocibles mediante técnicas microscópicas, debido a que no poseen distintivos morfológicos precisos: Tratándose de células mononucleadas pequeñas, agranulares, semejantes a pequeñas células linfoides, cuya cuantificación se cifra en una por cada 2000 elementos medulares nucleados. Estas células sólo pueden estudiarse mediante técnicas de cultivo *in vitro* y el marcaje de sus antígenos de diferenciación por anticuerpos monoclonales ^{102, 180}.

Los tres pilares principales en el área de desarrollo de técnicas de clonación de células precursoras hematopoyéticas, en *agar* o *metilcelulosa* han sido Bradley y Metcalf (1966) en Australia, Pluznik y Sachs (1965) en Israel, y Mc Culloch y colaboradores (1968) ^{73, 132, 164}.

Los sistemas de cultivo *in vitro*; desarrollados en las dos últimas décadas han supuesto un gran avance en el conocimiento de la hematopoyesis humana, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas.

Inicialmente se demostró, *in vivo*, la existencia de una célula hemopoyética pluripotente murina. Este hallazgo se debe a los estudios realizados por Till y Mc Culloch en 1961.

Posteriormente se desarrollaron las técnicas de cultivo *in vitro* de los diferentes progenitores hemopoyéticos comprometidos de la médula ósea de ratón, que fueron adaptándose a la médula ósea humana.

El 0.3 % de las células nucleadas de la médula ósea son células progenitoras hematopoyéticas, y el resto son células ya maduras las cuales ya no se dividen e incluso muchas de ellas mueren; cada una de las células germinativas (0.3%) proliferan en el medio de cultivo semisólido adecuado y dan origen a Unidades Formadoras de Colonias o Células Formadoras de Colonias (CFU o CFC), dentro de estas algunas van a producir colonias de tipo granulomonocítica (CFC-GM), eritroide (BFU-E, CFU-E), megacariocíticas (BFU-Meg, CFU-Meg) y linfoide T y B. Con las distintas técnicas de cultivo y las condiciones adecuadas, los diferentes progenitores hematopoyéticos indiferenciados son capaces de formar colonias constituidas por elementos en todos los estadios evolutivos de la línea hemopoyética a la que pertenece ¹⁸⁰.

La puesta en marcha de la técnica de cultivo *in vitro* para la célula hemopoyética pluripotente humana supuso muchas dificultades y su logro se debe a los trabajos realizados por Fauser y Messner en 1978⁴⁹.

El descubrimiento de los factores de crecimiento hematopoyéticos fue grandemente facilitado por la habilidad de crecimiento de las células hematopoyéticas *in vitro*. Estos ensayos son capaces de que precursores hematopoyéticos indiferenciados puedan proliferar y diferenciar en todas las líneas celulares hematopoyéticas ¹⁸⁰.

10.1.1. UNIDAD FORMADORA DE COLONIA

Mayani y Lansdorp mostraron que las células tronco (CD 34⁺) derivadas de la médula ósea adulta o de cordón umbilical pueden separarse en diferentes subpoblaciones de acuerdo a la expresión del antígeno CD45RA (isoforma del antígeno común de los leucocitos) y del antígeno CD71 (receptor de transferrina). De esta forma, las células tronco que expresan altos niveles de CD45RA y bajos niveles de CD71 darán origen a los progenitores mieloides (CFU-G), mientras que las células tronco que expresan bajos niveles de CD45RA y altos niveles de CD71 darán origen a los progenitores eritroides (CFU-E). En contraste las células tronco que expresan bajos niveles de CD45RA y de CD71 darán origen a los progenitores mixtos (CFU-GEMM) ¹²⁴.

Por lo que las unidades formadoras de colonias (CFU), son células que se originan de la diferenciación de la célula tronco. Cabe resaltar la amplia participación de la interleucina 3 durante la diferenciación hacia la línea mieloides y la línea eritroide ¹³².

Existen dos tipos de progenitores eritroides la BFU-E y CFU-E, estos representan estadios secuenciales de la maduración eritroide. Las células formadoras de "bursas" eritroides (BFU-E), se les

denomina así por su característica de crecer *in vitro* formando agrupaciones de varias colonias. La célula formadora de colonia eritroide (CFU-E), produce colonias de tamaño pequeño que están constituidas por células que contienen hemoglobina; la eritropoyetina actúa estimulando la división celular de los progenitores eritroides y su posterior maduración a proeritroblasto ^{85,180,201,228}.

La unidad formadora de megacariocitos (CFU-Meg) requiere la presencia de la trombopoyetina y el factor de estimulación del crecimiento megacariocítico. ^{85,180,228}

Las características más importantes de CFU-GEMM son: el tamaño de la célula que oscila entre 25 a 30 μ de diámetro, el núcleo ocupa el 75 % del área celular, los núcleos son visibles y el citoplasma presenta afinidad tintorial basofílica. Esta unidad de colonias mixtas, contribuye a la producción de los granulocitos, eritrocitos, monocitos y macrófagos ^{124,132,180}.

La caracterización funcional de las células CD 34⁺ ha sido de particular importancia en los últimos años no sólo para entender las bases biológicas de la hematopoyesis si no también en términos de aplicación clínica; ya que se ha mostrado que poblaciones enriquecidas de células CD34⁺ pueden ser expandidas en cultivos *in vitro* suplementados con diferentes citocinas, un procedimiento con potenciales aplicaciones en el trasplante autólogo ¹²⁴.

10.2. SISTEMAS DE CULTIVO PARA MEDULA OSEA O SANGRE PERIFERICA

En la actualidad existen tres sistemas de cultivo in vitro de células hemopoyéticas.

- 1) Los cultivos semisólidos
- 2) Los cultivos líquidos con estroma medular
- 3) Los cultivos líquidos sin estroma medular

10.2.1. CULTIVOS SEMISOLIDOS

Los cultivos semisólidos se basan en las características propias del medio, ya que, este permite proporcionar el soporte adecuado e inmovilizar las células, en presencia de factores de crecimiento hematopoyéticos apropiados, las células precursoras hematopoyéticas proliferan unidas sin dispersarse y producen una colonia clonal de células diferenciadas, la que puede ser detectada cuando se observa al microscopio invertido ^{85,132}. Los cultivos semisólidos comúnmente utilizados son agar, metilcelulosa o plasma coagulado; duran aproximadamente entre 14-18 días y después empiezan a perder consistencia e integridad, debido a su tiempo de vida se les denomina cultivos de corto-término ⁸⁵.

La primera característica de este sistema permite el conteo de colonias, con lo cual es posible inferir el número de células precursoras en la población celular inicial. Ya que hay una relación lineal entre el número de colonias formadas y el número de células cultivadas. La

segunda característica de los cultivos clonales es la relación dosis respuesta que existe entre la cantidad de factor de crecimiento y el número de colonias formadas. La relación dosis-respuesta es de tipo sigmoidal donde se tiene una fase lineal y una fase de meseta. La porción lineal en la curva nos permite determinar la cantidad de Actividad del factor de crecimiento ³².

10.2.2. CULTIVOS LIQUIDOS

Los sistemas de cultivo líquido permiten que las células madre hematopoyéticas (CFU-S) más primitivas o bien células madre, tallo, tronco ó seminales proliferen, así como, la producción de células precursoras de granulocitos (CFU-G), y la granulopoyesis extensiva puede ser mantenida por varios meses (cultivos de largo-término); en tanto que en los cultivos semisólidos no es posible. Dexter y colaboradores demostraron que los linfocitos, granulocitos y eritrocitos de médula ósea de ratón puede propagarse en cultivos líquidos, en el que se formarán monocapas que le servirán de matriz a las células sanguíneas ^{132,164}.

Los cultivos líquidos consisten de una población de células adherentes y no adherentes. La población adherente contiene células mononucleares fagocíticas, células "epiteliales" y células grasas gigantes. Esta última puede ser particularmente importante para el mantenimiento de células madre y además hay una fuerte tendencia en la maduración de granulocitos agrupados selectivamente en y alrededor de las áreas de agregados de las células "grasas gigantes".

En la ausencia de estas células "grasas gigantes" no hay mantenimiento de las CFU-S ⁴³.

Es posible manipularlos precisamente por la ventaja de que estos son medios líquidos que permiten recambios continuos del medio, en intervalos de 3 a 7 días los cultivos son "alimentados" eliminando la mitad del medio de crecimiento (5 ml) y adicionando un volumen igual de medio de crecimiento fresco. Por arriba de un periodo de 3 semanas, el número de células no adherentes declina (así como CFU-S y CFU-C) y una placa de células adherentes (células fibroblastoides, epiteloideas y mononucleares fagocíticas) vuelven a establecerse ^{207,219}. Después de tres semanas los cultivos son "recargados" es decir alimentados como antes, con 5 ml con medio de crecimiento, conteniendo posteriormente 10^7 células de médula ósea femoral fresca singénica aislada (es decir, que contienen 3,000 CFU-S y 15,000 CFU-C) a partir de ratones de la misma edad. En tales cultivos la proliferación de células en suspensión (no adherentes) y la producción de células madre por diversos métodos modificados han sido observadas ^{43,82,131}.

En comparación con los medios semisólidos los medios en suspensión líquida no permiten cuantificar el número de células progenitoras y precursoras, por estar entremezcladas ³².

En los cultivos líquidos podemos tener dos variantes: los llamados cultivos con estroma (con capa adherente y no adherente) arriba señalado y los cultivos sin estroma. Los cultivos que tienen estroma no

es necesario agregarles factores de crecimiento, por que la misma capa de estroma provee de factores hematopoyéticos ¹⁶¹.

Los cultivos sin estroma evidentemente necesitan el aporte de factores hematopoyéticos, la mayoría son factores recombinantes obtenidos por técnicas de ingeniería genética con DNA recombinante; el tipo de factores que nosotros incluyamos va a depender de lo que nosotros queramos hacer, hay factores que actúan sobre células muy primitivas y factores que actúan sobre células más maduras. Este tipo de medios son especialmente utilizados para la proliferación y/o expansión de las células madre hematopoyéticas (Stem Cell) ^{163,191,220}.

Se han realizado estudios para conocer los efectos de los diferentes factores de crecimiento solos o en combinación sobre las CFU-S y la supervivencia de la repoblación de células madre a largo plazo en cultivos de suspensión líquida, algunos de éstos estudios se han realizado por David M. et.al., quienes observaron el efecto de 10 factores de crecimiento hematopoyéticos. La IL-3, G-CSF, e IL-4 solos pueden mantener las CFU-S en cultivos de suspensión líquida, y la supervivencia de CFU-S se ve incrementada sinérgicamente por combinación de IL-3 con G-CSF, IL-1 α , y GM-CSF y por la combinación de IL-4 y 6 así como IL-1 α e TNF α en cultivos líquidos con estroma actúan sinérgicamente en la producción de GM-CSF ^{55,206}. Solamente IL-3 e IL-4 solas pueden mantener la habilidad de repoblación a largo término en cultivos de suspensión líquida, y la habilidad de repoblación se incrementa por la combinación de IL-6 o de G-CSF con IL-3 ^{12,17,101,131,155}. Así mismo, la IL-1 β recombinante

humana tiene un efecto directo e indirecto sobre la expresión en células progenitoras en cultivo líquidos ⁸⁹. El TNF- α es capaz de bloquear la diferenciación de progenitores primitivos al mismo tiempo que hay estímulos de proliferación en cultivos de largo término ¹⁷².

10.3. ACONDICIONAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS HUMANAS

El acondicionamiento de los sistemas de cultivo semisólido y líquido comprende una serie de elementos necesarios para garantizar un crecimiento óptimo de células pluripotenciales humanas. Los medios de cultivo contienen por lo tanto nutrientes como el suero fetal bovino, antibióticos, sustancias inductoras de la mitosis, factores de crecimiento de acuerdo a la necesidad de la línea celular a proliferar y las células hematopoyéticas en estudio. Cada tipo o sistema de cultivo tiene sus propias variaciones, unos son semisólidos y otros líquidos y cada uno de ellos puede ser modificado de acuerdo a un determinado protocolo de estudio.

Existen sistemas de cultivo especiales para el desarrollo de las líneas granulomonocíticas normales humanas (Pike y Robinson), que han permitido caracterizar las fases más precoces del compartimiento granulo-monocítico, a través del conocimiento de sus precursores celulares CFU-GM, regulados humoralmente por el CSF. Así mismo se han desarrollado técnicas de cultivo in vitro, para precursores

celulares leucémicos (medios condicionados con fitohemaglutinina) de lo cual hablaremos más adelante.

10.3.1. METODOS FISICOS DE SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES DE MEDULA OSEA Y/O SANGRE PERIFERICA PARA CULTIVO

Para facilitar la investigación a realizar en los sistemas de cultivo, se han implementado diferentes técnicas para purificar células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea humana, de sangre periférica y sangre de cordón umbilical.

Existen suficientes datos que demuestran que el cordón umbilical posee suficientes células hematopoyéticas para su uso en los sistemas de cultivo in vitro, y por supuesto para ser aplicadas en los trasplantes alogénicos en niños.

Las muestras de médula ósea y sangre periférica pueden proceder de pacientes con trastornos hematológicos y de pacientes sanos. La médula es colectada con heparina sódica (50 U/ml) y se mezcla con 5 ml de medio de cultivo y se procede a la separación celular específica¹⁹⁰.

Para obtener células progenitoras hematopoyéticas a partir de sangre periférica es necesario administrar al paciente una dosis fija de factor estimulante de colonias granulocíticas G-CSF de 600 µg/24 hrs., durante 6 días continuos para movilizar sus células mononucleares a la sangre periférica, (durante un período de recuperación de la aplasia

post quimioterapia tanto en la fase de inducción como de consolidación) estas células se recolectan durante tres días seguidos a partir del quinto día de la aplicación del CSF, mediante féresis de flujo continuo (Fenwal CS-3000); criopreservando las células en cada evento^{39,132}. Hoy en día la práctica de recolección de células pluripotentes a partir de sangre periférica por citaféresis han permitido considerar el autotrasplante de Células Progenitoras de Sangre Periférica como una alternativa terapéutica real de trasplante autólogo de médula ósea.

Las técnicas de separación con mayor éxito están basadas en las diferencias en :

1) tamaño de la célula; 2) densidad celular (gravedad específica); 3) cambios en la superficie celular; 4) superficie química de la célula (afinidad por lectinas, anticuerpos, o medios cromatográficos^{11,190}; 5) Dispersión total de la luz por célula; y 6) emisión fluorescente de uno o más constituyentes celulares o anticuerpos absorbidos³².

La técnica a utilizar dependerá de los recursos económicos con que cuente cada laboratorio . La técnica más utilizada por su bajo costo es la que se basa en la densidad celular, utilizando soluciones de Ficoll Hypaque y Percoll; no obstante hoy en día la citometría de flujo (técnicas 5 y 6) es empleada por su especificidad en el aislamiento de Stem cell (CD34+)^{11,52,209}.

El número de células para cultivo varía según el estudio pero en general se siembran 5×10^4 células/ml¹³².

10.3.2. COMPOSICION DE LOS MEDIOS SEMISOLIDOS

Soluciones

1.- Medio de Dulbecco Modificado por Iscove IMDM para cultivos de agar (AIMDM)

Sistemas Semisólidos:

Estos medios se encuentran compuestos por:

IMDM	35.32g
H ₂ O	780 ml
Penicilina (60mg/ml)	1.0 ml
Streptomycin (100 mg/ml)	0.4 ml
DEAD-dextran (50mg/ml solución)	3.0 ml
L-Asparagina	0.4 g
NaHCO ₃	9.8 g
β-Mercaptoetanol	11.8 μl

Colocar 780 ml de agua en un matraz de 1 lt y agregar un agitador magnético. Gradualmente adicionar el polvo prepesado y agitar al mismo tiempo. Adicionar los demás reactivos con agitación continua. El medio es preparado libre de endotoxinas, esterilizando mediante filtros, checar la esterilidad por cultivo y distribuir en alícuotas de 100 ml. Estos son sellados y almacenados a 4°C. Cada

preparación de AIMDM se prueba por cada lote antes del uso de rutina. El pH debe ser al alrededor de 7.1. Este no puede ajustarse si es incorrecto. Las osmolaridad del medio preparado debe ser de 200-300.

2.- Agar: 0.6 g de agar y 100 ml de H₂O. Pesarse el agar en un matraz de 500 ml, adicionar 100 ml de agua Milli-Q, y colocar el tapón holgadamente. Llevar a ebullición por 2 minutos sobre una flama de gas. Preparar inmediatamente antes de cultivar y mantener a 45°C en baño de agua. Cada nuevo lote de agar debe ser probado contra el lote utilizado comúnmente. Antes del uso de rutina.

3.- Suero fetal de ternera (FCS): El FCS es utilizado como fuente de nutrientes en cultivos celulares. Lotes de FCS son extensivamente probados antes de ser utilizados, para obtener resultados óptimos en cultivos semisólidos. Estos son también titulados para determinar la concentración óptima (usualmente con una concentración final de 15-30%); durante el tiempo de almacenaje del FCS deberá estar a -20°C mínimo 2 años y a -70°C a lo largo de 10 años. La centrifugación puede ser necesaria para remover cualquier sedimento que se forme después del descongelamiento. De lo contrario está listo para su uso.

4.- Solución de Eosina para el conteo de células viables: Preparar solución stock, 10 % (peso/volumen) de polvo de eosina-amarilla en salina normal; mantener a 4 °C. Mezclar 0.2 ml de solución de stock de eosina con 8.6 ml de salina normal y 1.5 ml de FCS para preparar la solución de trabajo. Almacenar a congelación.

5.- Factores de Crecimiento Hematopoyético : Si son comprados comercialmente, estos deben ser previamente probados para determinar la cantidad óptima requerida para la formación de colonias. Si los medios condicionados son preparados, estos también requieren pretitulación para determinar la concentración óptima de la máxima estimulación de colonias. Estos estimulantes deben ser divididos en alícuotas a una concentración de al menos 10 veces más alta que la usada finalmente en las placas de cultivo. Estos pueden almacenarse a congelación. Pero no deben recongelarse una vez que se han descongelado ya que puede dar como resultado una actividad disminuida.

6.- Medio de Dulbecco modificado por Iscove de una sola capa: Adicionar todo el polvo de IMDM (88.3 g) a 4.8 Lt de agua desionizada doblemente destilada y mezclar suavemente. Lavar por dentro el contenedor para remover todas las trazas de polvo. Adicionar 15.12 g de NaHCO_3 (bicarbonato de sodio) y agitar: Adicionar 29.5 μl de β -mercaptoetanol, 2.5 ml de penicilina (60 mg/ml de solución stock), y 1 ml de estreptomina (100 mg/ml de solución stock). Conservar en contenedores con sello, mezclar la solución, esterilizar con filtros y almacenar en alícuotas de 500 ml en botellas selladas a 4 °C.

7.- Preparación de mitogeno. Debe ser preparado poco antes de su uso, algún material no usado debe ser descartado. Preparar el polvo con 5 ml de agua desionizada, doblemente destilada. Tomar del contenedor, y diluir 1:15 (v/v) en agua bidestilada ^{32,164}.

10.3.2.1. Etapas de preparación:

1. Llevar el AIMDM a temperatura ambiente.
2. Preparar la solución de Agar.
3. Contar las células viables usando el hemocitómetro y la eosina. (1×10^5 células mononucleares para ser sembradas del pacientes y de 2×10^5 células en cultivos de control). También se puede utilizar la viabilidad celular por exclusión del azul de tripano (0.4%)^{52,132,209}.
4. Sacar los cultivos disponibles en reserva, indicar el número de discos de cultivo, estimulantes a emplear, y el número de células para cada placa de cultivo.
5. Poner el número requerido de placas de cultivo en la bandeja de incubación y numerar la tapa individualmente de acuerdo al número de cultivo de reserva.
6. Adicionar los estimulantes requeridos para una apropiada placa de cultivo como se describe en los cultivos de reserva. Usualmente para cada cultivo, la cantidad requerida de estímulos es adicionada en 0.1 ml para cada placa de cultivo. Esta cantidad puede ser menor pero no debe ser excedida porque el agar no dispone de gel.

7. Adicionar AIMDM, suero fetal bovino, agar y células (en este orden), por tubo o frasco y mezclar con vortexing. Esto es esencial para que las células sean adicionadas posteriormente a esta mezcla, y sólo después de la mezcla de los reactivos el medio es de proporción-simple. Para cada grupo de cultivo, dejar 1 ml de medio de agar para cada cultivo, además de al menos 1 ml extra por pérdida en el pipeteo. Para cada ml de cultivo, mezclar los reactivos en la siguiente proporción: 0.3 ml de AIMDM, 0.2 ml de FCS, 0.5 ml de agar, 0.1 ml de células en solución salina normal. Estas proporciones tienen una concentración final de suero fetal bovino de aproximadamente el 20 % (por volumen). Si se requieren preensayos de concentraciones altas y bajas de FCS se ajusta la cantidad de AIMDM, de tal manera que la mezcla de AIMDM y FCS sea igual a 0.5 ml por cada ml de cultivo.
8. Se ponen alícuotas de un volumen de 1 ml en cajas petri y con movimientos rotatorios mezclar el estimulante y las células contenidas en el medio de agar.
9. Permitir que el gel se mezcle y colocar en un incubador conteniendo humedad al 100% con 5-10 % de CO₂ en el aire.
10. Después del período de incubación requerido (normalmente 7 días para cultivos de murino y 14 días para cultivos humanos) sacar los cultivos del incubador y contar las colonias usando el estereomicroscopio Olympus SZ. Las colonias murinas se caracterizan por tener más de 50 células y las colonias

humanas tienen más de 40 células (algunos investigadores cuentan como colonias humanas cuando se tienen más de 20 células). El microscopio se coloca en un fondo oscuro y el lado cóncavo del espejo es ajustado hasta que las células aparecen blancas en el fondo oscuro³².

11. Posteriormente los agregados y las colonias se aíslan con una pipeta pasteur fina bajo control microscópico. Paralelamente se separan las placas enteras y se deshidratan sobre un porta, realizándose un estudio morfológico con tinción panóptica de May-Grünwald-Giemsa y con otras técnicas citoquímicas (Mieloperoxidasa, Fosfatasa alcalina leucocitaria, Fosfatasa ácida, y azul de prusia) como las describe Torres et al.^{53,132,209}. También se pueden realizar análisis mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales utilizando para ello técnicas inmunoenzimáticas, como fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina, así mismo poder realizar estudios citogenéticos y caracterización por citometría de flujo^{159,171,203}.

10.3.3. MEDIOS CONDICIONADOS

Los medios condicionados se preparan a partir de líneas celulares, tejido aislado fresco, o de linfocitos activados que proveen de una buena actividad estimulante de colonias; los más comúnmente utilizados son:

1. *Placenta*. Una buena fuente de GM-CSF es la placenta humana. Las placentas frescas son finamente cortada en cuadros

pequeños, lavada con solución salina fría, y dispersando de 6 a 10 piezas por 100 mm de tejido en placas de cultivo conteniendo 20 ml de medio GIBCO con 5 % de suero fetal bovino. Las placas son incubadas a 37 °C con CO₂ al 5 %, incubar de 5 a 7 días; el sobrenadante es removido y centrifugado, filtrando con millipore y almacenarlo a -20 °C. Para medir la actividad óptima se prueba una serie de diluciones, ya que estas pueden tener alguna actividad inhibitoria por altas concentraciones.

2. *Medio condicionado con Fitohemaglutinina (PHA)*. Este es preparado por incubación de células mononucleares sanguíneas (1×10^6 /ml) en un medio alfa conteniendo PHA-M (Difco) a una concentración final de FCS 1%, 10 %, y 5×10^{-5} de mercaptoetanol. Después de 7 días el medio es cosechado y filtrado y puede ser almacenado a -20 °C por varias semanas.

3. *Líneas celulares*. Las líneas celulares humanas tales como la línea celular Mo producen factores estimulantes de colonias y se han establecido a partir de tumores y de sangre periférica normal.

4. *Capa alimentadora de células blancas sanguíneas*. Capas alimentadoras de leucocitos de sangre humana han sido utilizadas de rutina como una fuente de actividad estimulante de colonias en cultivos de agar de doble capa. Su mayor limitación es la extrema variabilidad en la producción de GM-CSA entre las células de diferentes donadores.

5. *Factores de crecimiento purificados.* Comúnmente, el GM-CSF humano, con actividad estimulante para monocitos, eosinófilos y granulocitos, y el G-CSF, específico para granulocitos son disponibles comercialmente.

Existen dos variantes generales de los sistemas semisólidos:

Los cultivos de una sola capa.

En este tipo de cultivos la actividad estimulante de colonias es incorporado directamente en el cultivo y se prepara como se menciona arriba.

Los cultivos de doble capa.

En cultivos de agar de doble capa la actividad estimulante de colonias es proveída por una monocapa de leucocitos inmovilizados en un 0.5% de agar. La capa inferior se prepara usando la misma formula como para 0.3% de agar ^{32,228,229}.

10.3.4. MEDIOS LIQUIDOS

Soluciones

Todos los reactivos deben ser previamente probados para checar su habilidad de soporte o mantenimiento en el crecimiento de los cultivos.

1. Medio de Fischer (Gibco) suplementado con 50 U/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomycin y conteniendo 16 mM (1.32 g/l) de NaHCO_3 .

Para alícuotas de medio de crecimiento descrito arriba en alícuotas de 100 ml deben ser suplementadas con 10^{-6} M de "succinato de hidrocortisona de sodio" y 20 % de suero de caballo (el succinato de hidrocortisona de sodio se prepara como una solución stock en medio Fischer y se almacena a -20°C).

2. Cinco ratones de diferentes razas existentes, jeringas estériles de 1 ml con aguja de calibre 21, gasas, tijeras, tapones, pinzas y frascos para cultivo de tejido de 25 cm^2 ⁴³.

10.3.4.1. Etapas de Preparación

1. Sacrificar al ratón donador por dislocación cervical, desinfectar la piel con alcohol del 70 % y remover ambos fémurs. Colectar ambos fémurs en una caja de petri en hielo conteniendo medio de Fischer. Un fémur contiene $1.5 - 2.0 \times 10^7$ células nucleadas.
2. - En una campana de flujo laminar, limpiar cualquier remanente de tejido muscular usando gasa. Detener el fémur con forceps y cortar al final de la rodilla. El calibre 21 necesariamente debe caber en forma apropiada en la cavidad del hueso. Cortar el otro extremo del fémur tan cercano a la punta como sea posible. Insertar la punta del hueso en una botella de 100 ml en medio de crecimiento y aspirar/ empujar el émbolo de la jeringa varias veces utilizando toda la médula ósea que se salió fuera del fémur. Repetir el procedimiento con otros nueve huesos.

3. Dispersar en una fina suspensión por pipeteo los numerosos centros de la médula por medio de una pipeta de 10 ml. No hay necesidad de disgregar a grupos pequeños de células. Deposite alícuotas de 10 ml de la suspensión celular en frascos de cultivo para tejido de 25 cm², agitar en forma circular la suspensión frecuentemente para hacer que la distribución celular sea igual en todos los cultivos. Los frascos se incuban y se gasean con CO₂ humedecido al 5 %, colocando los cultivos horizontalmente a 33 °C.

4. Los cultivos son alimentados semanalmente. Agitando gentilmente los frascos para suspender las células adherentes libres. Remover con 5 ml de medio de crecimiento incluyendo la suspensión celular, teniendo cuidado de no tocar la capa de células adherentes con la pipeta. Adicionar 5 ml de medio de crecimiento fresco a cada frasco; evitar dañar la capa adherente, no agregando el medio directamente sobre esta. Gasear los cultivos y poner en el incubador ^{143,164,228}.

10.4. MEDIOS DE CULTIVO PARA CELULAS PROGENITORAS DE LA LINEA GRANULOMONOCITICA (G/M)

El cultivo *in vitro* de células codificadas hacia diferenciación granulocítico/monocítica (CFC-GM) presentes en médula ósea y en sangre periférica, es un procedimiento ampliamente usado en los últimos años tanto en estudios experimentales como en clínica humana^{52,209}.

Dentro de los medios semisólidos la técnica más aplicada para el cultivo *in vitro* de las células formadoras de colonias granulomonocíticas (CFC-GM) en la médula ósea y sangre periférica es la metodología de doble capa de agar descrita por Pike y Robinson en 1970¹⁵². El principio de la técnica descrita por estos autores se fundamenta en que las células medulares puestas en suspensión en medio de cultivo semisólido, dan lugar a la formación de colonias constituidas por granulocitos y monocitos en todos los estadios madurativos (ver fig. 10.1). El crecimiento de las CFC-GM requiere la presencia, en el medio de cultivo, del factor estimulante de colonias GM-CSF que, como se ha mencionado previamente, esta presente en ciertos líquidos biológicos como suero y orina y resulta segregado por células de una gran variedad de tejidos y órganos^{52,62, 85,198, 234}.



Fig. 10.1 Desarrollo de células hematopoyéticas en cultivo.
Fotografía Dr. Héctor Mayani, Hospital de Oncología. CMN Siglo XXI

El Factor estimulante de colonias puede ser aportado al medio de cultivo bajo forma líquida (medio condicionado), siendo incorporado en la suspensión celular o por células secretoras incluidas en una capa nutritiva semisólida dispuesta bajo la capa de células diana; el factor estimulante difunde de la capa inferior a la superior.

Preparación de la capa inferior

Está constituida por 9 volúmenes de medio de cultivo de McCoy modificado (adición de suero bovino fetal, aminoácidos, vitaminas y penicilina-estreptomicina) y un volumen de gel de agar al 5% (concentración final de agar en el cultivo : 0,5%) . Previamente a la gelificación del medio resultante, se añadieron las células destinadas a la producción de CSF (leucocitos de sangre periférica de donantes voluntarios reconocidos como buenos productores de CSF in vitro), a una concentración de 1×10^6 /ml de medio de cultivo. La suspensión resultante se distribuyó en alícuotas de 1ml para cada una de las cajas

de Petri estériles de 35 mm de diámetro. Tras la gelificación a temperatura ambiente, las cajas se colocan en una estufa a 37°C con alto grado de humedad y atmósfera de 7,5% de CO₂ en el aire. Las cajas se emplean para el cultivo a más tardar una semana después de su preparación.

Preparación de la capa superior

Está constituida por 9 volúmenes de medio de McCoy modificado y un volumen de gel de agar al 3% (concentración final del agar en el cultivo: 0,3%). Previamente a la gelificación del medio resultante, se introdujeron las células a cultivar, a una concentración de 2×10^5 /ml para estudios en individuos normales; disponiéndose de alícuotas de 1ml para cada caja de Petri conteniendo una capa inferior. Tras la gelificación a temperatura ambiente, las cajas de Petri con doble capa se colocan en una estufa con atmósfera altamente húmeda y 7,5% de CO₂ en aire. (ver fig. 10.2).

Todo el proceso de manipulación de éste material se realiza bajo condiciones estériles rigurosas (material estéril, campana de flujo laminar)^{54,83,85,198,228}.

Las células dispuestas en el medio de cultivo se incuban durante un período de tiempo que oscila entre 7 y 14 días⁸⁵.

Cultivos celulares "in vitro" en la leucemia aguda

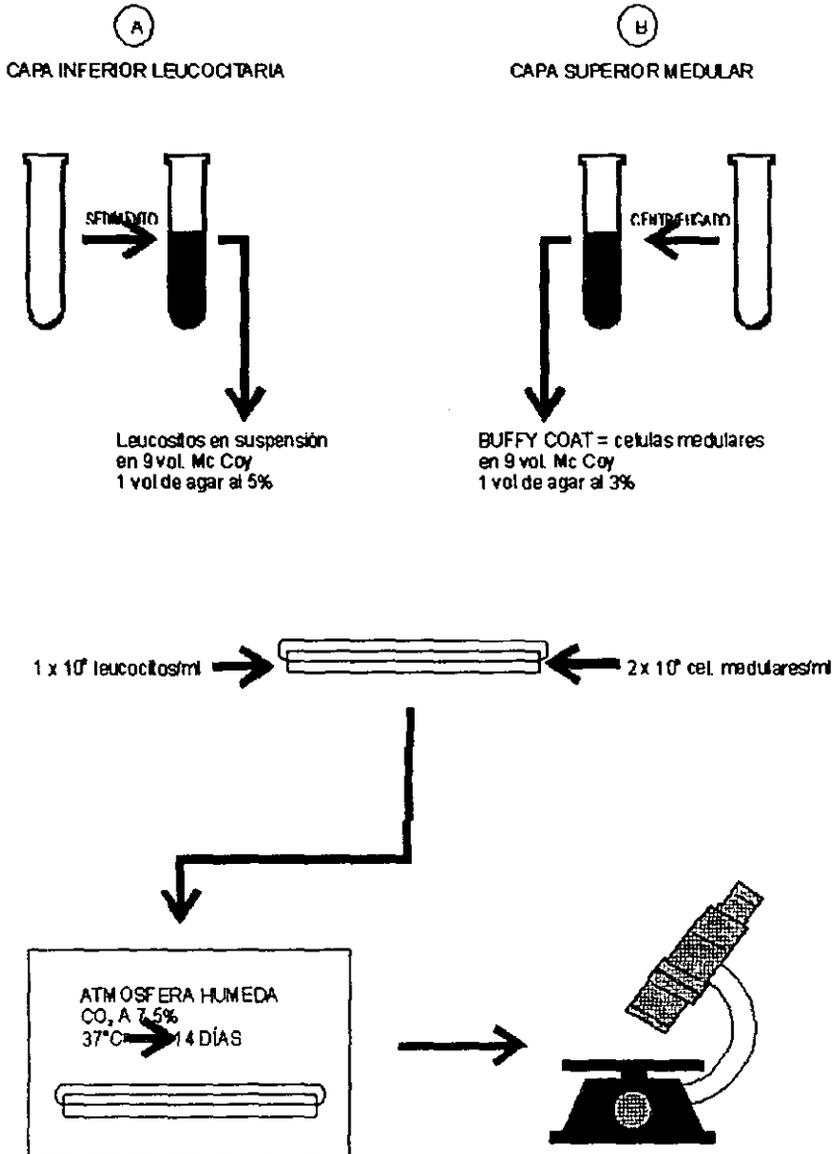


Fig. 10.2. Esquema de la técnica de cultivo en agar con doble capa Pike y Robinson (317).

A las agrupaciones celulares que se forman en el medio de cultivo se denominan agregado o colonia según contengan un número inferior o superior a 50 células respectivamente. Además de las CFU-GM , y como célula intermedia entre esta y el mieloblasto se halla un progenitor más diferenciado responsable de la formación de agregados, la Unidad Formadora de Colonias Intermedias (CIFU) ^{85,198}.

La mayoría de las células que se forman en el día 7 de incubación son de neutrófilos. En el día 14 predominan las granulomonocíticas y en periodos más avanzados los eosinófilos ⁸⁵.

10.5. USO DE MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO EN SMD Y LANL CON ALTERACION EN LA LINEA CELULAR GRANULOMONOCITICA (G/M)

La principal aplicación clínica de los cultivos semisólidos es la cuantificación de células progenitoras hematopoyéticas y de esta manera ver patrones de crecimiento en sujetos normales y sujetos con enfermedades hematológicas. Es decir, podemos valorar el poder de autorrenovación y proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas haciendo un conteo del número de colonias formadas en el cultivo semisólido.

En los medios de cultivo líquido, no podemos cuantificar progenitores o unidades formadoras de colonias; pero si mantener la hematopoyesis por largo tiempo, así como, proliferar las células hematopoyéticas.

Los sistemas de cultivo para células hematopoyéticas y sangre periférica se han empleado con fines de diagnóstico, pronóstico y tratamiento en las hemopatías clonales y estos pueden variar de acuerdo al protocolo de investigación de un grupo de trabajo; algunos ejemplos sobre su aplicación son los siguientes:

1. Es bien conocido que la hematopoyesis a corto tiempo in vitro, a partir de células tronco de médula ósea y/o sangre periférica se puede llevar a cabo en medios semisólidos suplementados con factores estimulantes de la diferenciación (eritropoyetina, GM-CSF, IL-3, etc.) o con extractos de leucocitos.

No obstante poco se sabe a cerca de qué es lo que lleva a las células tronco a diferenciarse y de cómo pueden autoconservarse. Esto se debe en parte a la incapacidad de mantener a estas células por períodos prolongados in vitro. En México, el grupo de Marché et. al., en el Instituto Nacional de Cancerología han propuesto cultivar a las células tronco hematopoyéticas en un medio líquido sin factores estimulantes, suplementado con suero fetal de carnero y fitohemaglutinina, con el objeto de mantener y diferenciar a dichas células y permitir por una parte el conocimiento básico del proceso hematopoyético y por otra el brindarle al clínico la posibilidad de conocer la posible respuesta que tendrían las células tronco in vivo a partir de su comportamiento in vitro. Punto importante en el trasplante autólogo¹¹⁷.

2. La producción adecuada de células sanguíneas periféricas depende de un perfecto equilibrio de la fracción proliferativa de células hematopoyéticas pluripotenciales. La adquisición de propiedades asociadas con células maduras parece estar asociada con una pérdida de propiedades de potencial proliferativo. Pacientes con leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide crónica en crisis blástica usualmente presentan una población de células con morfología predominantemente primitiva y que fallaron en la adquisición de las propiedades de células maduras. En LMA las circunstancias son aún más complejas, ya que en algunos pacientes solamente la fracción granulocitaria aparece como perteneciente a la clona leucémica, mientras que otros pacientes involucran granulocitos y también una mínima parte de precursores eritroides.

Por lo tanto, se ha observado que los patrones de crecimiento en medios de cultivo de las células de LMA tienen valor pronóstico predictivo, particularmente, blastos con alta proporción de células con capacidad de autorrenovación están asociadas con un mal pronóstico. Sobre la base de la forma de crecimiento, la leucemia mielocítica aguda puede dividirse en un grupo de buen pronóstico, con un índice de remisión de 52 %, y un grupo de mal pronóstico, con un índice de remisión de 10 %. Se reconocen cuatro formas principales de crecimiento: 1) formación de colonias, 2) grandes racimos (40 células), 3) pequeños racimos (20 células) y 4) falta de crecimiento. De

ahí que, en lo futuro, el papel que jueguen los factores estimulantes y supresores de colonias sea definitivo ^{40,153,198}.

3. En el momento del diagnóstico, los patrones de crecimiento *in vitro* de la células progenitoras granulomonocíticas presentan diferencias entre las leucemias linfoblásticas y las no linfoblásticas. Los blastos de la leucemia linfoblástica tienen poca o nula capacidad de crecer *in vitro* ⁵³. En los pacientes con leucemia aguda no linfoblástica (LANL) puede observarse un crecimiento atípico de los elementos blásticos medulares, con una relación colonia-agregado anómala. Se reconocen dos grandes tipos de crecimiento, el denominado "no leucémico" y el "leucémico". En el primero existe una escasa formación de colonias, mientras que el segundo se registra un crecimiento de un elevado número de agregados (agrupaciones celulares de menos de 50 células). A estos patrones de crecimiento se les atribuye un valor pronóstico altamente significativo, relacionándose a los leucémicos con escasas remisiones completas y a los no leucémicos con un mejor pronóstico ^{40,180}.

El crecimiento en cultivo de la leucemia aguda humana muestra una dependencia absoluta del GM-CSF a lo largo de toda su actividad proliferativa, con una capacidad de respuesta en muchos aspectos similar a la de las CFU-GM normales, aunque con un mayor potencial proliferativo. Así, mientras los agregados normales predominan en fases precoces de cultivo y experimentan posteriormente fenómenos de lisis con breve supervivencia en el medio, los correspondientes a

población leucémica mantienen su capacidad proliferativa aún cuando ya han adquirido morfología de agregado pudiendo progresar a formaciones de mayor tamaño si las condiciones nutricias del medio, fundamentalmente disponibilidad de CFS son las adecuadas. Por esta razón, la lectura de la proliferación leucémica debe realizarse tempranamente (días 7-10 de cultivo), dado que más tarde puede haber confusiones con un patrón normal (proporción supuestamente adecuada entre agregados y colonias) o falso aumento en la incidencia de macrocrecimiento leucémico⁵⁴.

La aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* para el estudio de las leucemias agudas ha sido difícil, debido a la inespecificidad del GM-CSF ya que este estimula la proliferación tanto de precursores normales y leucémicos. El empleo de medios condicionados con fitohemaglutinina (PHA) permiten obtener una estimulación "específica" del crecimiento leucémico. Este fenómeno es de especial interés en la valoración *in vitro* de leucemias en remisión, en las que un supuesto patrón proliferativo normal con GM-CSF puede incluir agregados leucémicos de difícil identificación. Para algunos autores, los precursores leucémicos que responden a PHA podrían corresponder a la auténtica "stem cell" neoplásica, mientras los que lo hacen al GM-CSF expresan una fase ontogénicamente posterior, en la que la baja actividad proliferativa sería debida a mecanismos de autocontrol del tamaño de la población celular leucémica⁴⁰.

A partir de medios condicionados con lisados de células leucémicas obtenidos de ellas se demostró, en un número elevado de pacientes leucémicos la presencia de un efecto supresor humoral, denominado LIA ("Leukemic Inhibitory Activity"). Este efecto supresor se ejerce sobre precursores CFU-GM de médula normal en fase activa de médula normal, y se hace manifiesto tanto en presencia de un aporte exógeno tanto de CSF como en crecimiento "espontáneo" en cambio, la proliferación de precursores leucémicos o de precursores normales de pacientes leucémicos en remisión, es resistente al efecto supresor de la LIA. Es probable que este *in vivo* se deba a) a la supresión directa de la "stem cell" (mecanismos humorales, interacciones competitivas) e interferencia con la producción de factores estimulantes de su proliferación, entre ellos el CSF ⁵⁴.

En términos generales, la normalización de los patrones de crecimiento de CFU-GM durante el tratamiento de la LANL, se ha esgrimido como un indicador de remisión hematológica, mientras que la persistencia de un patrón de crecimiento anómalo después de alcanzar la remisión completa generalmente anuncia una recaída leucémica ¹⁸⁰.

4. Las técnicas de cultivo celulares han puesto de manifiesto que pese a la homogeneidad morfológica de las células leucémicas, la gran mayoría de los blastos están parcialmente "diferenciados" y solamente una pequeña fracción celular (0.05-1 %) es capaz de sufrir un número suficiente de divisiones *in vitro* para formar una colonia. A esta población celular se le ha

denominado unidad formadora de colonias leucémicas (CFU-L). En la actualidad el poder disponer de técnicas de cultivo celulares que promueven la formación de colonias leucémicas ha permitido el estudio *in vitro* de la hematopoyesis leucémica. Existen hasta la fecha trabajos realizados para el análisis de LMA *de novo* siendo muy escasa las referencias a las leucemias secundarias^{3,40}.

5. La investigación de unidades formadoras de colonias leucémicas (CFU-L) podría emplearse para detección de la Enfermedad Residual Mínima (ERM), pues parece ser una estrategia sensible, si bien su especificidad puede ser baja debido a frecuentes falsos positivos. A pesar de estos falsos positivos, Gerhart et. al. sugieren un valor predictivo para éstos estudios al observar asociación entre recaída precoz (< a 6 meses) y con un número elevado de CFU-L en el momento de la remisión completa (RC). Una alternativa al estudio de CFU-L es el análisis de CFU-GM. Recientemente hemos observado que un patrón de crecimiento anómalo de CFU-GM puede alertar de una eventual recaída¹⁷⁷.
6. La obtención de cultivos celulares *in vitro* de células leucémicas es un excelente medio para poder determinar el comportamiento biológico de diversos productos; por punción de médula ósea o por medio de una simple toma de sangre periférica, se pueden obtener las células con capacidad para seguir su reproducción *in vitro*.

Los intentos por cultivar médula ósea humana normal son más difíciles, ya que la cantidad de células progenitoras es muy pequeña. Sin embargo, en pacientes con leucemia aguda se logra obtener células progenitoras abundantes ya que es la clona que prolifera.

7. Durante el proceso de la proliferación celular aparecen ciertas proteínas en la membrana celular que se identifican como receptores para diversas proteínas de acuerdo al grado de diferenciación y la función celular que desempeñan; esto le sirve como marcador a las células para identificarlas en la etapa de desarrollo que se encuentran. Algunos de estos, cumplen una función específica como son los receptores y la fracción Fc de la IgG (Rfc), y la fracción C3 del complemento (RC3) en la fagocitosis inmune en la autorregulación de linfocitos B y en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

El tratamiento de quimioterapia antineoplásica (Qt) con que son tratados los pacientes con leucemia, producen inhibición celular de aquellas células que están en mayor actividad, como son las células neoplásicas, aunque también se dañan las células normales.

Es común que la mayoría de estos medicamentos alteren la síntesis de DNA y RNA por lo que interfieren la aparición de receptores en la células.

El poder de recuperación de las células sanas dañadas por la quimioterapia es muy variable de acuerdo con la velocidad que normalmente tengan para reproducirse.

Se han realizado ensayos *in vitro* de células leucémicas humanas que permiten valorar los efectos de los fármacos antineoplásicos, (amethoptelina, arabinósido de citocina, vincristina, idoxorubicina) sobre la viabilidad, proliferación y la capacidad funcional en la formación de rosetas EA (eritrocito unido a anticuerpo para identificar receptores a Fc) y EAC (eritrocito unidos a anticuerpos más complemento para identificar receptores a C3 de complemento) de los leucocitos y recuperación de los mismos, lo cual permite utilizarlos como un índice de sensibilidad *in vitro* y por separado de los quimioterápicos utilizados en el tratamiento de los pacientes con leucemia ¹⁴³.

Los cultivos *in vitro* de médula ósea, especialmente de la línea granulomonocítica, han aportado gran ayuda en el diagnóstico, pronóstico, evolución clínica y comprensión fisiopatológica de los Síndromes Mielodisplásicos ⁵².

8. Las CFC-GM de médula ósea en los SMD pueden mostrar un comportamiento *in vitro* variable, que oscila entre el patrón de crecimiento normal y el observado con mayor frecuencia en la leucemia aguda no linfocítica LANL: disminución o ausencia de colonias, acompañado de crecimiento de agregados (crecimiento leucémico). En la AR y ARs predomina un

crecimiento normal. En la AREB y la AREBt el patrón más característico es el leucémico. En la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) el papel es totalmente distinto al observarse un llamativo incremento del número de agregados y colonias en el día 10 y que es aún superior en el día 14. Este comportamiento es muy diferente con el AREB, en el que se observa un aumento de macroagregados en ausencia de colonias, sin diferencia entre los días 10 y 14, ni el fenómeno de la estimulación espontánea del cultivo, propio también de la LMMC. La LMMC presenta en la gran mayoría de los pacientes un patrón característico, que se manifiesta con un exuberante crecimiento de agregados y de colonias constituidas la mayor parte de ellas por monocitos y macrófagos. Así mismo, presenta la peculiaridad de que el crecimiento (crecimiento espontáneo) puede tener lugar en ausencia del factor de crecimiento de colonias (CSF) en el medio de cultivo a diferencia del resto de SMD, en el que el crecimiento de CFC-GM requiere la presencia constante de CSF. Este comportamiento permite diferenciar la LMMC del resto de los SMD y de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC); en ésta también existe un exuberante crecimiento in vitro, pero éste es a expensas de progenitores neutrofilicos y es más dependiente de los factores de crecimiento^{53,180}.

En cualquier caso, una alteración progresiva del patrón de crecimiento puede advertir sobre una probable transformación leucémica¹⁸⁰.

Burgaleta, estudio los patrones de proliferación y maduración celular en medios de cultivo líquido y semisólido de las células de médula ósea y sangre periférica en pacientes con LMMC. Observando que la médula ósea proliferaba normalmente en ambos medios de cultivo, obteniéndose un número normal de colonias (CFU-C) en agar. Su maduración en medio líquido era así mismo buena, siendo inferior al 10% el número de elementos jóvenes que existen en el cultivo al cabo de 7 días. En sangre periférica la proliferación y número de colonias obtenidas también era normal, encontrándose enlentecida su transformación a macrófagos en el cultivo en medio líquido ⁶³.

Haciendo una valoración funcional de los monocitos encontró que estas células mantienen su capacidad de elaborar sustancias estimuladoras de colonias (CSA) y su capacidad de quimiotaxis, siendo claramente inferior a lo normal la fagocitosis para *Candida*, aunque se conserva la actividad fungicida ²⁶.

La ausencia total de crecimiento representaría la abolición de la clona normal e incapacidad de la patológica para crecer *in vitro* circunstancia que se registra en la fase inicial de la evolución natural del SMD.

9. En los últimos años diversos estudios sobre SMD han evaluado las posibles implicaciones diagnósticas y pronósticas de las anomalías del cultivo *in vitro* de las células progenitoras granulocíticas (CFU-GM) de la médula ósea, los resultados son muy dispares y no todos los investigadores conceden el mismo significado a un patrón de crecimiento determinado. Ya que las cifras de colonias y agregados de los cultivos *in vitro* no dependen exclusivamente de las características de las células puestas en cultivo, observándose una gran variabilidad en los resultados según la técnica empleada, la cantidad de células sembradas, medios e inductores de crecimiento utilizados. Todo se debe a que la comparación de resultados entre distintas series sea realmente compleja ^{8,62,197,216}.

El tipo de crecimiento *in vitro* de los precursores granulopoyéticos en los SMD ha permitido en ocasiones reconocer grupos de enfermos con un pronóstico diferente, los datos que aporta deberían ser incluidos junto con otros parámetros clínicos, hematológicos y citogenéticos, en el estudio de los pacientes con SMD ⁶².

10. Los cultivos *in vitro* de las células germinales granulomonocíticas (CFU-GM) de médula ósea en pacientes con SMD se ha encontrado una relación entre la blastosis medular y los datos del cultivo. Así, la incidencia de una cifra anómala de CFU-C aumenta de manera aparente al hacerlo la proporción medular de blastos. De hecho, todos los pacientes

con una blastosis medular superior al 10% presentan un número anormal de colonias. Del mismo modo, la cifra de agregados en el cultivo tendió a elevarse al hacerlo la proporción medular de blastos. Aunque el tamaño de los agregados no muestre una asociación aparente con la blastosis medular⁶².

11. En conclusión, la aplicación de los cultivos *in vitro* de las CFU-GM en médula ósea para el estudio de los SMD es importante por los siguientes puntos:

- En el diagnóstico de los SMD, ayudando a perfilar sus variedades.
- En determinadas situaciones, como una desviación a la izquierda de la granulopoyesis en que existiendo una médula con signos morfológicos no definitivos con aumento numérico de blastos y promielocíticos, el diagnóstico diferencial con anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) puede resultar comprometido en estas circunstancias, un patrón de crecimiento anómalo junto aún porcentaje elevado de CFU-GM de densidad ligera apunta hacia el diagnóstico de un SMD.
- Para establecer el diagnóstico diferencial en casos limítrofes entre LMMC y AREB, el cultivo de la CFU-GM puede ser fundamental.

-Para evaluar más adecuadamente la participación de la clona granulomonocítica en las anemias refractarias sideroblásticas (ARS).

-Puede ofrecer orientación pronóstica, ya que un patrón de crecimiento en donde hay disminución del número de colonias y aumentado el número de agregados (macroagregados), cabe esperar una evolución clínica peor que si aquél fuera normal

52,53,62

10.6. APLICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE MEDULA OSEA O SANGRE PERIFERICA DURANTE LA TERAPIA DEL TRASPLANTE DE MEDULA OSEA

Los sistemas de cultivo también han sido de gran utilidad en los pacientes candidatos a un trasplante autólogo o alogénico permitiendo el estudio hematopoyético antes y después del mismo, de lo cual referimos algunos ejemplos :

Hasta 1988 el proceso que se seguía para la elección de la pareja donante-receptor en el TMO , incluye primero la tipificación serológica para los antígenos HLA-A,-B,-C . Una vez que se ha encontrado un donante HLA-A,-B,-C idéntico al receptor se procede la realización de un cultivo mixto de linfocitos entre ambos, para analizar si hay identidad en el determinante HLA-D. Si existe tal identidad, se procede al trasplante ^{119,151}.

La eficiencia de un trasplante autólogo de médula ósea (TAMO) está determinada por la posibilidad de erradicación de células leucémicas por quimioterapia, junto con la eliminación in vitro de células neoplásicas residuales en la médula ósea utilizada en el trasplante, y que son potencialmente capaces de perpetuar la enfermedad.

A pesar de la eficiencia de los tratamientos erradicativos de quimio/radioterapia existen recidivas, especialmente en trasplantes efectuados en remisiones subsiguientes a la primera. Es difícil determinar la eficacia del TAMO pues no es posible evaluar hasta qué grado las recaídas son debidas a la ineficiencia de los regímenes de acondicionamiento o a la reinfusión de células presentes en el injerto. Debido a esta segunda posibilidad se han desarrollado varios sistemas que son potencialmente capaces de eliminar las células leucémicas residuales de forma más o menos selectiva, entre éstos , se encuentran algunos derivados de la ciclofosfamida como la mafosfamida (ASTA-Z) y la 4-hidroperoxiciclofosfamida (4-HC). Se ha demostrado que estos compuestos son eficaces contra los progenitores leucémicos pero que también son tóxicos a progenitores hematopoyéticos normales como las CFU-GM; BFU-E y CFU-GEMM pero en modelos murinos se ha visto que respeta a la CFU-S más inmaduras Debido a la falta de técnicas para detectar las células totipotenciales humanas Aglietta et.al. han desarrollado un sistema cultivo líquido de corto término(15 días) para detectar la persistencia de progenitores más inmaduros que las CFU-GM, después de la

deplección in vitro con ASTA-Z . Lamana, et.al., utilizaron un método similar, con un cultivo líquido de 21 días intentando detectar progenitores aún más inmaduros.

Estos sistemas de cultivo podrían ser un buen método para monitorizar una toxicidad no irreversible sobre la hemopoyesis en purgados de médula ósea con quimioterapia in vitro ^{103,180}.

Los cultivos líquidos con estroma han tenido un desarrollo o aplicación clínica muy interesante se sabe que in vivo en un sujeto con leucemia, su sistema hematopoyético normal se ve reducido hasta en un 1% y el resto es hematopoyesis anormal con células neoplásicas o leucémicas en donde una clona neoplásica a tomado a su cargo casi la totalidad de la médula ósea. En cambio, en un sujeto sano todo su sistema hematopoyético es normal. A corto plazo, uno de los campos del trasplante en los que más se está trabajando es en la expansión de células progenitoras in vitro. Las células progenitoras identificadas por la expresión de un Ag en su membrana (el Ag CD34+) se seleccionan o purifican y, posteriormente, una vez que tenemos una población CD34+ pura, ésta es estimulada in vitro con citocinas, generalmente IL1, IL3, IL6, SCF y EPO. La expansión del número de progenitores in vitro permitiría la administración al paciente de varias tandas de quimioterapia mielo-ablativa, infundiéndole después fracciones de esas células CD34+. Los primeros estudios se han realizado en pacientes con tumores sólidos y los resultados son prometedores.

En resumen, el uso de los medios de cultivo in vitro hoy por hoy, constituye un importante campo de investigación sobre los mecanismos normales y fisiopatológicos de la hematopoyesis humana y por tanto interesante para el conocimiento de sus mecanismos de regulación.

Es posible, además que tales estudios coadyuven a definir mejor una serie de cuestiones de interés clínico, tales como el tipo de proceso leucémico, el grado de remisión del mismo, para evaluar la respuesta o eficacia de trasplante de médula ósea y la sensibilidad a las medidas terapéuticas.

CAPITULO 11

TRASPLANTE DE MEDULA OSEA

11.1. GENERALIDADES

El trasplante de médula ósea (TMO) es un tratamiento efectivo para una variedad de enfermedades hematológicas, malignas, inmunológicas y genéticas. Hasta 1993 alrededor de 20,000 TMO se han realizado en el mundo ^{14,144,187,207}. En el presente capítulo se revisaran los principios básicos del TMO sus complicaciones potenciales y su aplicación en el tratamiento de leucemias mieloides agudas (subtipos M4 y M5) y síndromes mielodisplásicos (subtipo LMMC).

El TMO consiste en la administración de un tratamiento citotóxico con dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia, que intenta la erradicación del tumor, y que tiene como efecto secundario letal la destrucción de la médula ósea. La recuperación de la actividad hematopoyética e inmunológica se consigue al suministrar la médula ósea de un donante compatible (allogénico) o del propio paciente (autólogo) previamente extraída ^{14,140}.

El tratamiento citotóxico tiene como objetivos a) producir una inmunosupresión del huésped, abatiendo la función celular de los linfocitos T y células Natural Killer; necesario para que injerte la médula ósea HLA parcial o totalmente compatible; b) la destrucción del clon celular tumoral que permita la erradicación de la enfermedad, y c) la

implantación de la médula ósea normal en un espacio libre de células tumorales ^{14,140,207}

El TMO tiene desde el punto de vista terapéutico las siguientes finalidades: a) aportar células con capacidad de autorrenovación; b) erradicar la población hematopoyética anormal tumoral (leucemias) o con alteraciones genéticas (talasemia) y sustituirla por médula ósea normal, y c) en tumores sólidos quimiosensibles con médula ósea normal, intentar la erradicación de la neoplasia con dosis altas de quimioterapia ^{14,180}

Los estudios iniciales del TMO se llevaron a cabo a partir de los años 40s en animales de experimentación (roedores, perros y monos) en los cuales recibieron irradiación corporal total de 500 a 700 cGv presentando posteriormente una insuficiencia medular letal sin toxicidad letal intestinal ni del SNC y en los años 50s se extendió su estudio en seres humanos ^{14,180}

En 1952 Lorenz demostró que la hematopoyesis podía ser restaurada en ratones irradiados con dosis letal mediante la administración parenteral de médula singénica.

Posteriormente en 1963, Mathé describió por primera vez el cuadro clínico de enfermedad de injerto contra huésped ^{70,180}.

En 1964, Dausset et al describen al primer antígeno HLA (HLA-A2) y caracteriza el sistema de histocompatibilidad básico para la selección del donante de médula ósea. Hasta 1960 los resultados obtenidos en la aplicación del TMO no eran satisfactorios; y no es sino

hasta 1975 cuando el grupo Seattle precisa la tecnología del TMO y sus indicaciones en leucemias agudas y aplasia medular, así como el control de las complicaciones ¹⁸⁰.

11.2. IMPORTANCIA DEL SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDAD (HLA)

La capacidad que el tiene el organismo de actuar frente a sustancias extrañas (antígenos), así como la posibilidad de rechazar injertos de transplantes (aloantígenos), son características comunes de las especies vertebrados. Para ello se requiere de un mecanismo de defensa inmune humoral, como de una defensa inmune celular. Ambos procesos son efectuados por células linfoides, con memoria inmunológica y capaces de producir una respuesta intensa, cuando hay un segundo contacto con el antígeno ¹⁰⁷.

En el fenómeno de un rechazo a un transplante se reconocen como extrañas ciertas moléculas presentes en el tejido injertado, y este rechazo puede ser agudo (en las dos primeras semanas posteriores al transplante) o crónico (semanas o meses después de haberse efectuado el transplante). En los vertebrados capaces de estas reacciones agudas se halló una pequeña región cromosómica en la que se situaban numerosos genes que controlan estas reacciones inmunológicas, formando lo que se denomina el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) también llamado human lymphocyte system A (HLA) y son los que proporcionan a los tejidos de cada individuo su propia identidad dentro de la especie ^{5,14,118,140}.

El HLA consiste en una serie de antígenos de superficie celular, cuyos genes se localizan juntos en el cromosoma 6 (tabla 5.1). Estas moléculas, difieren mucho entre individuos no relacionados, unen fragmentos de proteínas extrañas y propias para presentarlas a los linfocitos T y el blanco a las respuestas alogénicas ^{42,112,133}.

tabla 11.1 ANTIGENOS HLA ⁴².

CLASE I	CLASE II
A	DR
B	DQ
C	DP

Los antígenos clase I se expresan en todas las células somáticas, presentan péptidos sintetizados dentro de las células que presentan linfocitos T CD8+ ^{42,118}.

Los antígenos clase II se expresan en los linfocitos B, macrófagos y células dendríticas, presentan péptidos incluidos por endocitosis celular, presentan a los linfocitos T CD4+ ^{42,118}.

Para el TMO menos del 40% de los pacientes tienen un hermano donador con HLA genotípicamente idéntico, y menos de 10% tienen un donador haploide-idéntico compatible para todos menos unos de los *loci* HLA importantes. Para poder beneficiar con el TMO a los individuos que no poseen un donador relacionado HLA compatible (DR) se ha investigado sobre fuentes alternas a través de donadores no relacionados HLA-compatibles (DNRC) que son genotípicamente

pero no fenotípicamente compatibles para los antígenos HLA-A,B y DR
42,67,70

La prueba de histocompatibilidad es vital para el TMO de DNRC, su tipificación debe ser muy exacta, por que de lo contrario sería potencialmente grave. Por el contrario, la prueba para selección de DR puede ser tan simple como determinar qué cromosomas paternos o "haplotipos" heredaron el paciente y sus hermanos y descartar la presencia de recombinación genética. Con la aplicación de procedimientos de biología molecular desarrollados a partir de investigación HLA básica, los procedimientos de tipificación de HLA y selección de donadores están sufriendo una verdadera revolución. Los antígenos HLA A y B aún se determinan por serotipificación, pero los antígenos DR, DQ y DP se identifican por técnicas moleculares como la hibridación por sondas, la reacción en cadena de la polimerasa, para secuencias específicas e incluso la secuenciación directa del ADN de los genes HLA ^{67,70,140}.

En el Transplante de DR no todos los antígenos del HLA son idénticos. Se considera que el HLA A, B y DR son los determinantes más importantes de la respuesta alogénica, que dan origen a la enfermedad injerto contra huésped (EICH) y al rechazo al injerto. La disparidad HLA DP no parece ser tan importante para el desarrollo de EICH aguda. El HLA-C, un antígeno expresado en niveles bajos, puede tener un papel en el rechazo de injerto o en la EICH se desconoce el impacto del desequilibrio en HLA-DQ. Aún está surgiendo información sobre DQ y otros antígenos de HLA descritos recientemente, y se

requerirá un análisis retrospectivo de los datos sobre DNRC para determinar su importancia ⁴².

La aplicación de la biología molecular a las pruebas de histocompatibilidad ha permitido el reconocimiento de muchos alelos del HLA. Para el DR se han detectado más de 100 alelos (que especifican estructuras distintas de antígenos HLA), y el número continúa aumentando, en forma semejante a la del HLA-B. Cuando se considera esta heterogeneidad adicional en la selección de donadores, es más difícil lograr la compatibilidad exacta entre donadores y receptores no relacionados. Este dato indica también que deben emplearse de rutina métodos moleculares para tipificar todos los antígenos del HLA, porque subtipos potencialmente importantes han pasado desapercibidos por serotipificación. Esto es especialmente cierto en pacientes no caucásicos, el grupo en el que se han encontrado más variantes alélicas del HLA. Para cada persona determinada la probabilidad de encontrar un donador no relacionado con HLA exactamente igual varía mucho y depende del tipo de HLA del paciente, de su raza y del tamaño del reservorio de donadores. Los pacientes con haplotipos llamados "ancestrales" (17 % de la raza blanca) puede tener buena posibilidad de encontrar un donador histocompatible en un banco de donadores de buen tamaño. Para el resto de las personas, la probabilidad de encontrar un donador va en función de la frecuencia de sus antígenos HLA en la población de donadores y mejora mientras esta población sea más grande. Los pacientes pueden ser ayudados o limitados por su origen étnico porque

estos pueden diferir tanto en la frecuencia de antígenos de HLA como de haplotipos. Por ejemplo, la identificación de donadores es menos común en pacientes norteamericanos descendientes de africanos no sólo por la menor cantidad de donadores para éste grupo de donación, sino porque existe más cantidad de alelos y mayor diversidad de haplotipos en este grupo^{42,119}.

11.3. TIPOS DE TRASPLANTE

El tipo de trasplante esta relacionado con la procedencia de la médula ósea. Lo cual es importante por la selección del donante, dada la situación de la médula, potencialmente contaminada con células tumorales cuando es autóloga y por la EICH y la reacción injerto frente al proceso tumoral, potencialmente posible en los trasplantes alogénicos^{70,108,175}.

TMO *singénico*. La médula procede de gemelos univitelinos u homocigotos, por lo tanto idéntica a la del receptor desde un punto de vista genético e inmunológico^{14,119,180}.

TMO *autólogo*. Para el TMO autólogo el paciente necesita primero coleccionar, criopreservar y almacenar médula ósea. Esto ocurriría idealmente cuando la médula ósea es normalmente celular o no contiene células malignas. Posteriormente el paciente recibe quimioterapia intensiva ablativa medular y/o irradiación seguida por reinfusión de la médula criopreservada y así restaurar la hematopoyesis. Tanto en el TMO autólogo como singénico no existe

toxicidad tipo EICH ni aparente efecto antitumoral injerto frente a la leucemia.

La posibilidad de contaminación de la médula ósea autóloga en fase de remisión completa de una leucemia aguda o linfoma, ha permitido la posibilidad de un tratamiento *ex vivo* de la médula ósea con quimioterapia, anticuerpos monoclonales y cultivos a largo plazo para eliminar la posible enfermedad mínima residual (EMR) ^{70,180,187}.

El TMO autólogo se utiliza en leucemia aguda como terapia de intensificación. Este tipo de trasplante si no es el óptimo porque no tiene el nuevo sistema inmune antitumoral, sí logra el efecto de terapia de intensificación y logra excelentes índices de sobrevida libre de enfermedad ^{180,187}.

TMO alogénico. La médula ósea procede de un hermano HLA idéntico o de un DNRC. Se realiza como terapia de primera línea en postremisión. El papel del TMO alogénico es doble: reconstituir la médula ósea dañada por altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia con el fin de destruir la enfermedad, y además de que el sistema inmune trasplantado reconozca a las células tumorales del paciente y las destruya como un efecto antitumoral secundario ^{180,187}.

En recientes estudios se ha demostrado que el injerto de médula ósea alogénico fue igual de efectivo como terapia en leucemia aguda en niños y adultos ^{14, 158,175,228}.

El trasplante alogénico se caracteriza por presentar la toxicidad de la EICH y el efecto antitumoral frente a la leucemia ejercido por los linfocitos T citotóxicos^{37,128}.

11.4. REQUISITOS PARA UN TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA

Para poder llevar a cabo un TMO se cuenta con requisitos estrictos que lo limitan y que debe tratar de cumplir el paciente como son:

1. - Edad del paciente que debe ser menor de 50 años.
2. - Contar con un donador idéntico o histocompatible.
3. - La enfermedad al momento del trasplante debe no estar avanzada o ser sensible a la quimioterapia y/o radioterapia^{67,70,157,187}

Los enfermos mayores de 50 años no son candidatos para el TMO por encontrarse en una etapa de alto riesgo, así mismo sólo de un 25-30% de los enfermos contarán con un donador idéntico entre sus familiares y el restante 70-75% de los pacientes no serán candidatos a trasplante alogénico, quedándole las opciones de conseguir un donador no relacionado a través de los registros internacionales o bien el trasplante autólogo si la enfermedad está controlada y puede obtenerse médula ósea no contaminada con células tumorales.

Las complicaciones del trasplante se dividen en aquellas relacionadas al régimen de condicionamiento, aquellas relacionadas con el trasplante per se y aquellas relacionadas con la enfermedad que motivó el trasplante ¹⁵⁸.

El TMO de individuos no relacionados pero fenotípicamente idénticos en el sistema HLA, se lleva a cabo con regularidad usando bancos de médulas, con 1.8 millones de voluntarios hasta noviembre de 1995. La posibilidad de hallar un donador no relacionado es de aproximadamente 66 %.

La selección del donador implica seguir los siguientes puntos :

1. La edad del donador es de los 18 a los 55 años.
2. Deberá someterse además de las pruebas de histocompatibilidad a pruebas inmunológicas especialmente para el virus de la inmunodeficiencia (HIV) y Antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), sífilis, hepatitis, herpes simple, citomegalovirus, varicela zoster y el virus de Epstein Barr.
3. Realizarle un examen físico y clínico, tratando de evitar un riesgo en la anestesia ⁶⁷.

En México están registrados como centros de trasplante en el Internacional Bone Marrow Transplantation Registry, el Instituto Nacional de la Nutrición << Salvador Zubiran >>, el Instituto Nacional de Cancerología y el Centro de Hematología y Medicina Interna de

Puebla; en tanto que el Autologous Bone Marrow Transplantation Registry se encuentran registrados el Instituto Nacional de Cancerología y el Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla.

Debido a la infraestructura tecnológica y humana requerida así como los altos costos del procedimiento han hecho que estos tratamientos no hayan sido difundidos por todo el país (México)^{177,200}.

En la actualidad se han desarrollado métodos de obtención de células tronco que han desplazado el método tradicional de punción y aspirado de médula ósea, mediante procedimientos de movilización de células tronco de sangre periférica con factores de crecimiento hematopoyético o en estados de recuperación post quimioterapia, con lo cual se reducen costos y tiempo de implantación del injerto así como tiempo prolongado de pancitopenia^{9,18}. Otra fuente alterna es la obtención de células tronco a partir de sangre de cordón umbilical que tienen una incidencia baja de EICH y actualmente es utilizada en el tratamiento de la población pediátrica^{38,144}.

11.5. TECNICA DEL TRASPLANTE DE MEDULA OSEA

La técnica de extracción de la médula ósea es descrita por E.D. Thomas en 1970. El paciente (autólogo) o el paciente (allogénico o singénico) se somete a anestesia general o epidural, y se extrae la médula mediante punciones múltiples de las dos crestas ilíacas posteriores, y si fuese necesario de las crestas ilíacas anteriores, y el esternón. En cada punto se extrae un máximo de 3 ml para evitar una

dilución excesiva con sangre periférica y reducir el número de linfocitos T citotóxicos. El volumen aproximado extraído mediante 100 punciones es entre 600 y 1,200 ml (10 ml/kg), de donde debe obtenerse una cantidad mínima de 2×10^8 células mononucleadas/kg de peso del paciente. Estas cifras deben ser estrictamente respetadas o incluso superiores cuando la médula se somete a crioconservación o tratamiento *ex vivo*, debido a la reducción celular que se produce con la manipulación. La médula ósea se pasa por filtros de 300 a 200 μm y se coloca en una bolsa de transfusión para administrarla por vía intravenosa en 1 hora al paciente que es trasplantado como se esquematiza en la fig 5.1.

Quando la médula ósea procede del propio paciente, y se va realizar un trasplante autólogo, se concentra para aumentar la proporción de células germinales, reducir el volumen de hematíes y polinucleares así mismo facilitar la crioconservación y el tratamiento *ex vivo* si fuese necesario ^{67,70,140,180}

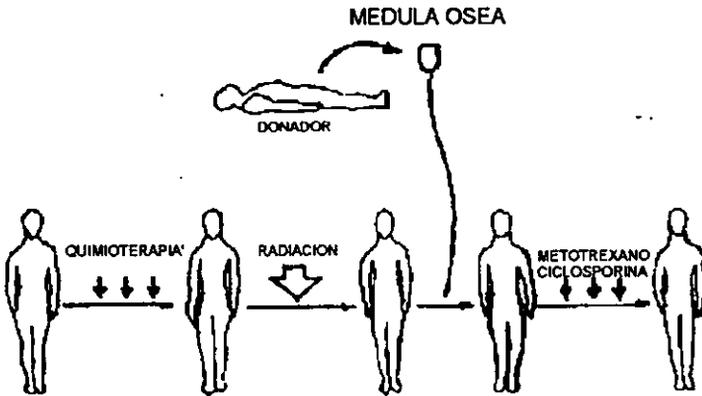


Fig. 11.1. Esquema típico de un trasplante de médula ósea (14).

11.6. COMPLICACIONES ASOCIADAS AL TRASPLANTE DE MEDULA OSEA

Enfermedad de injerto contra huésped (EICH). La EICH está mediada por linfocitos T citotóxicos y asesinos naturales (NK) provenientes del donador, que encuentran antígenos extraños en el cuerpo del paciente y éstos antígenos pueden estar localizados en órganos vitales como el hígado, tubo digestivo y piel principalmente. De acuerdo al grupo Seattle existen cuatro grados de afectación, considerando a los dos primeros leve y moderado mientras que el tercero y cuarto como graves o mortales. En el grado I y II afectan de uno a dos órganos en forma leve y los de grado III y IV afecta a tres órganos de forma severa provocando disfunción orgánica múltiple. En EICH desde el punto de vista clínico y evolutivo se distingue una forma aguda si aparece antes de los 100 días postrasplante y una forma crónica si aparece después; en ésta última se manifiestan fenómenos de autoinmunidad tales como : Síndrome de Sjögren, Esclerodermia, Miastenia Gravis, etc., se considera un estado morbozo pero de baja mortalidad. La forma aguda aparece entre el día 20 o 40 postrasplante iniciando generalmente con la aparición de una erupción eritematosa maculopapular en las palmas, plantas y lóbulos de orejas para posteriormente extenderse y en ocasiones afectar la totalidad de la superficie cutánea en forma de eritrodermia generalizada e internamente puede haber afectación hepática e intestinal que puede coincidir o no tras la afectación cutánea. Su

gravedad determina en la mayoría de las ocasiones el pronóstico de la EICH, causando directa o indirectamente un 20 % de mortalidad. La mortalidad generalmente se relaciona con complicaciones infecciosas secundarias a la gran inmunodepresión que induce la propia enfermedad y su tratamiento, y las lesiones cutáneo mucosas que facilitan la infección. Ocasionalmente, la causa de muerte es el fallo hepático o la perforación intestinal^{70,140,175,180,207,218}

El objetivo en EICH es prevenir su presentación, mediante una adecuada selección del donador, prefiriendo donadores 100% compatibles, y utilizando inmunosupresores o técnicas de depleción linfocitaria, el inmunosupresor más utilizado es Ciclosporina A con el cual se ha logrado reducir la incidencia y la severidad^{4,14,42,66,70,158,180,187,228}

Rechazo del Injerto. La incidencia de rechazo del injerto puede variar dependiendo del grado de disparidad del HLA entre donante y receptor, por un tratamiento insuficiente, por depleción de linfocitos T en la médula ósea del donante en un intento de evitar la EICH, también puede presentarse en pacientes con aplasia medular, especialmente en aquéllos sensibilizados por haber recibido un gran número de transfusiones previas o en los que reciben un número escaso de células^{175,207,218}

El rechazo del injerto se confirma mediante el estudio de antígenos eritrocitarios, citogenéticos o de DNA.

Aplasia medular. Debido a la terapia citotóxica, se observa pancitopenia severa, que amerita que el paciente sea ubicado en condiciones de aislamiento, para evitar infecciones de tipo I (bacteriano, y fúngico), tipo II (parásitos y virus) y el tipo III (viral)
110,175,207

Inmunodeficiencia: La inmunodeficiencia postransplante de TMO es consecuencia de la mieloablación ocasionada por la terapia citotóxica, por el uso de inmunosupresores desde horas antes de TMO, por la reconstitución inmunológica lenta que se lleva a cabo con las células del donador y que puede consumir un período de 6 a 12 meses postTMO y por la aparición de complicaciones como EICH que requiere manejo intensivo de inmunosupresores. En los estudios se encuentra una disminución cuantitativa de subpoblaciones linfocitarias, inversión de la relación CD4/CD8, disminución en inmunoglobulinas y disminución de transformación blástica^{4,70,175}.

Durante éste período es conveniente prevenir infecciones oportunistas. Posterior al primer año postTMO ésta complicación desaparece^{175,187}.

11.7. APLICACION DEL TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA EN LAM Y SMD CON AFECTACION EN LA LINEA GRANULOMONOCITICA

El trasplante de médula ósea (TMO) alogénico proveniente de un individuo HLA idéntico, aún constituye el método más eficaz de manejo con opción a cura en las neoplasias malignas hematológicas, como las leucemias agudas con factores de riesgos adversos, en leucemias mieloides crónicas y síndromes mielodisplásicos²⁰⁰.

El TMO tanto alogénico como autólogo es una modalidad terapéutica con potencial curativo en una importante proporción de pacientes con leucemia mieloblástica aguda^{37,112,188}.

Así pues en LMA la tasa de recaídas en sujetos trasplantados en primera remisión completa es de 20-25% un 40% en segunda remisión y un 50% en aquellos trasplantados en recaída²⁰⁷.

En Leucemia Mieloide Aguda (LMA) en primera remisión, el TMO alogénico tiene una probabilidad de sobrevida libre de enfermedad de 5 años del 60%, cifra que contrasta, con la obtenida en la quimioterapia sin TMO cuya sobrevida en LMA es del 10% a 3 años¹⁵⁸.

En Síndromes Mielodisplásicos (SMD) el TMO alogénico es el tratamiento de elección para aquellos pacientes jóvenes con SMD que tengan la suerte de contar con un donador compatible, los resultados del TMO pueden variar considerablemente dependiendo del subtipo de enfermedad (ARS, ASA, AREB, LMMC, AREBt) y del tiempo

transcurrido entre el diagnóstico y la presencia de anomalías citogenéticas.

Otras fuentes alternativas para el trasplante de células progenitoras están en estudio, como el trasplante de células de médula ósea parcialmente compatibles y, las variedades autólogas y alogénicas obtenidas de sangre periférica las cuales han demostrado ser un procedimiento capaz de restaurar la hematopoyesis en pacientes sometidos a quimio-radioterapia supraletal, los casos así tratados en SMD son aún escasos. Sin embargo de todos los tratamientos, el TMO alogénico es el único que puede ser potencialmente curativo y se reserva para casos seleccionados, generalmente jóvenes^{125,212}.

11.8. MIELOPOYESIS DESPUES DEL TMO

Los estudios de las tasas de prendimiento del injerto de las células mieloides y linfoides después del TMO son complejos por los múltiples medios en los que se realiza la técnica. Las respuestas de recuperación de los pacientes con leucemia difieren de la aplasia. Las médulas y las respuestas inmunes de los anteriores pueden haber sido lesionadas drásticamente por los regímenes quimioterapéuticos de intensidades variables, y además los pacientes leucémicos adicionalmente reciben grandes dosis de irradiación en todo el cuerpo antes de la infusión medular. Mientras los pacientes con aplasia reciben sólo tratamiento inmunosupresor antes del trasplante, pero puede haber estado expuesto a una lesión del estroma medular que

haya iniciado su enfermedad. Estas diferencias clínicas sugieren que la variabilidad del <<suelo>> en el que se <<siembra>> la médula es tan variable entre los grupos de pacientes que solamente se pueden hacer comparaciones aproximadas de las tasas de recuperación.

El sistema linfohematopoyético de los receptores de TMO alogénico o singénico, es anulado mediante agentes citotóxicos antes de la infusión medular.

La propia infusión comprende sólo un número pequeño de progenitores mieloides tanto maduros como inmaduros. Los primeros superan a los últimos con una proporción de al menos 10 a 1. El proceso de recuperación empieza casi inmediatamente después de la infusión ¹⁴⁰.

La recuperación habitual de un TMO alogénico se inicia por una elevación de reticulocitos a partir del 10º día que coincide con la aparición de médula ósea de algunos precursores granulocíticos y eritroblásticos aislados entre los días 5º y 10º, los cuales forman islotes mieloeritroides regenerativos entre los días 9º y 15º, indicando la presencia de injerto de la médula. Los eritrocitos recientemente formados tienen varias características fetales incluyendo una macrocitosis, una elevada densidad del antígeno superficial y un aumento del nivel de hemoglobina fetal en casi todas las células. Los datos actuales sugieren que esta onda de células eritroides de tipo fetal es el resultado de la diferenciación prematura de las células progenitoras en las que los genes ordinariamente expresados durante la vida fetal no están totalmente apagados. Los neutrófilos alcanzan

cifras de $0.1 \times 10^9/l$ hacia el 16° día y $1 \times 10^9/l$ sobre el día 26° y el recuento de plaquetas por encima de $20 \times 10^9/l$ se alcanza una semana después de la elevación de los neutrófilos, entre los días 20° y 25°.

Entre los días 15° y 30°, la médula adquiere mayor celularidad, aunque permanece hipoplásica durante un tiempo que en ocasiones puede ser prolongado. La reconstitución completa inmune postrasplante dura entre 1 y 2 años en receptores cuya médula ósea no ha sido manipulada en el laboratorio. Se retrasa este proceso cuando ha existido EICH crónica o cuando ha sido deplecionada la médula de células T. El déficit de células T puede favorecer el no prendimiento y la recaída de la leucemia, aunque reduce los efectos o la aparición de EICH ^{103,175}.

La recuperación de la función linfocitaria demostrable después del TMO es lenta e impredecible. La primera oleada de linfocitos morfológicamente idéntificables se observa a las dos semanas. La elevación del recuento de linfocitos a los límites normales suele completarse en 1 a 3 meses después del trasplante, excepto en algunos pacientes con una EICH crónica, pero las células son difíciles de caracterizar ¹⁴⁰.

El trasplante con células progenitoras de sangre periférica (CGSP) o la administración de G-CSF o GM-CSF postrasplante suele acortar en 1 semana el periodo de recuperación por aportar o estimular a precursores intermediarios de la granulopoyesis. Por el contrario, los

tratamientos ex vivo de la médula ósea retrasan la recuperación hematopoyética²⁷.

La confirmación de la implantación de un injerto médula ósea alogénico se realiza por técnicas que definen la existencia de una quimera hematopoyética con características del donante como son el cariotipo, la cromatina sexual, los sistemas de grupo eritrocitario, las isoenzimas eritrocitarias y linfocitarias, la tipificación HLA en los TMO que no son idénticos, el alotipo de las inmunoglobulinas y el análisis de las secuencias de DNA¹⁸⁰.

11.9. FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO EN EL TRASPLANTE DE MEDULA OSEA

Recientemente el uso clínico de factores de crecimiento hematopoyético clonados (CSFs) para pacientes que recibieron TMO es de gran interés. Los CSFs e interleucinas pueden tener diversos papeles importantes: (1) favorecer el injerto y prevenir su rechazo, (2) estimular más rápidamente la recuperación de la hematopoyesis, (3) estimula la recuperación inmunológica e incrementa la defensa del huésped, y (4) facilita la recolección de células tronco de sangre periférica o médula ósea^{9,18,175,205,227}.

Los CSFs pueden ser usados para estimular las células hematopoyéticas del donador para favorecer el injerto y la recuperación hematológica. Otro enfoque podría ser manipular el estado inmunológico de el receptor para favorecer el injerto. El riesgo de infección seguido por TMO esta relacionado con la severidad de la

granulocitopenia, la cual puede ser potencialmente anulada por el uso de los factores de crecimiento ^{159,123}.

Diversos centros han estudiado el uso de rhGM-CSF seguida de un TMO autóloga. GM-CSF acelera la recuperación de los granulocitos comparada con controles; no hay cambio en la recuperación de plaquetas o eritrocitos. En otros estudios con médula ósea autóloga tratada no reporto beneficios al administrar GM-CSF ²⁷.

Ensayos en humanos usando rhGM-CSF en TMO alogénica han demostrado una acelerada recuperación de granulopoyesis sin exacerbación de enfermedad rechazo contra huésped.

El G-CSF también acelera la recuperación de granulocitos después de un TMO autóloga, con una velocidad de recuperación similar a la lograda con GM-CSF. No influyó en la recuperación de eritrocitos o plaquetas ^{116,223}.

Otros estudios sugieren que el M-CSF también puede incrementar la recuperación de granulocitos, probablemente por inducir la liberación de otros CSFs de los macrófagos.

La interleucina 1 (IL-1) incrementa la recuperación hematopoyética seguida de drogas mielosupresoras y después de un TMO autóloga se ha estudiado. Un curso corto de tratamiento de IL-1 podría acelerar la recuperación de granulocitos y posiblemente de plaquetas. Muchos de los efectos de la IL-1 son mediados por IL-6.

Los efectos biológicos mediados por estos factores solos o en combinación establecieron cambios, su uso racional puede ser seriamente evaluado. Estos regímenes podrían jugar un papel importante en la reducción de mortalidad y morbilidad relacionada al TMO ^{57,59}.

11.10 Futuro del Transplante

La purificación de células CD34+ y su utilización en el transplante podría ofrecer ventajas como la eliminación de la población tumoral residual (si ésta es CD34-), ventaja muy importante en el transplante autólogo, o disminuir probablemente el riesgo de EICH al no administrar células T maduras (las cuales son CD34-). Otra posibilidad a realizar a partir de las células CD34+ será la ingeniería genética. Como ya se ha dicho antes, otra línea importantísima del transplante es la utilización de célula de cordón umbilical para transplante alogénico.

COMENTARIOS

Al revisar cada uno de los temas y en especial los de cultivos *in vitro* y Trasplante de Médula Osea, nos hemos dado cuenta que aún hay mucho por conocer en ésta área, por lo que, es necesario estudiar y buscar una especialización en estos temas ya que pueden representar una práctica terapéutica definitiva en el tratamiento de las neoplasias mieloides.

Debido a la relativa incidencia de la Leucemia Miolomonocítica Crónica y los subtipos de Leucemias Agudas M4 y M5, se encuentran pocas referencias bibliográficas en las que se investigue específicamente sobre ellas, sin embargo, consideramos que se abordaron los conocimientos básicos que permiten tener una idea clara acerca de lo que se pretende investigar a través de los diferentes sistemas de cultivo de células progenitoras hematopoyéticas *in vitro*; e interpolar a dichas patologías.

Consideramos que nuestro trabajo de tesis es útil para el estudiante de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, ya que se tiene una revisión bibliográfica actualizada que nos introduce en el estudio de la hematología (puesto que en la carrera no existe la materia como tal) y además, nos proporcionar la inquietud para seguir investigando, y hacer estudios de posgrado, sobre todo en el tema de métodos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades hematológicas.

Tratando de buscar información más concreta acerca de la utilidad de los sistemas de cultivo in vitro, tuvimos la oportunidad de entrevistarnos con el Dr. Mayani H. (investigador del Hospital de Oncología de CMN S XXI) quien nos orientó sobre el uso que tienen los sistemas de cultivo in vitro y las perspectivas que se tienen en el tratamiento de algunas mielopatía.

Sabemos que en otros países desarrollados de Europa y Norteamérica se han dado grandes avances al respecto y que en México en un tiempo no muy lejano, estaremos a la vanguardia de esta nueva Tecnología- Biomédica, para el tratamiento de diferentes hemopatías. Por lo tanto, nuestro trabajo insta a los profesionales del área químico-biológica a interesarse en este campo de investigación que es la Expansión celular en cultivo y El Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas Autólogo y Singénico.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmad YH; Kiehl R; Papac RJ. *Myelodysplasia. The Clinical Spectrum of 51 Patients.* Cancer 1995; 76(5): 869-874.
2. Akashi M; Koeffler H.P. *Control of Hematopoietic Growth Factors Progress in Clinical and Biology Research.* 1990; 325: 257-267.
3. Almeida, J. et.al. *Estudio de las Células Clonogénicas de las Leucemias Agudas Secundarias a Síndromes Mieloproliferativos y Mielodisplásicos.* Sangre 1994; 39(5): 331-335.
4. Antin J.H; Bierer B.E. et.al. *Selective Depletion of Bone Marrow T Lymphocytes With Anti-CD5 Monoclonal Antibodies: Effective Prophylaxis for Graft-Versus-Host Disease in Patients With Hematologic Malignancies.* Blood 1991; 78(8):2139-2149.
5. Arellano J., Salcedo M., et.al. *Obtention of HLA Antigen System Typifying Monospecific Sera.* Arch. Invest. Med. (Méx.)1982; 13(7):7-10.
6. Arellano, Martínez G L. *Eritropoyetina Mecanismo de Acción y Aplicación Terapéutica.* Tesis de Licenciatura en QFB; Cuautitlán, edo.de México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 1992. 87 p.
7. Backx B; Broeders L; Löwenberg B. *Kit-Ligand Improves In Vitro Erythropoiesis in Myelodysplastic Syndrome.* Blood 1992;80(5): 1213-1217.
8. Baines P.;Masters J.S. et.al. *Enrichment of Haemopoietic Progenitor Cells From the Marrow of Patients With Myelodysplasia.* B. J. Haematol. 1988; 68:159-164.
9. Beguean F.; Bayle Ch. et.al. *Collection and Cryopreservation of Peripheral Blood Progenitor Cells (PBPC) Mobilized by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) for Autologous Transplantation.* Blood 1995;86(10): supplement 3907.
10. Benitez, Aranda Herminia et.al. Sección : *Síndromes Hereditarios de Falla de la Médula Osea.* AMHC 1997; 49(Sup.1) 22-27.
11. Berardi, Anna C. Wang, Alai et.al. *Functional Isolation and Characterization of human Hematopoietic Stem Cells.* Science 1995; 267(6): 104-158.
12. Berridge M V, Horsfield J A, et. al. *Evidence that Cell Survival is Controlled by Interleukin-3 Independently of Cell Proliferation.* J. Cell. Physiol. 1995; 163:466-476.

13. Best, Charles Herbert. *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. 11 ed.; Tr.2 Buenos Aires: Médica Panamericana, c1987. 1572 p.
14. Bick, Roger L. *Hematology Clinical and Laboratory Practice*. USA: Mosby, c 1993. 2 vols. 2890 p.
15. Birds, Leavell. *Hematología Clínica*. 3de. México D.F.: Interamericana, c1973, 688 p.
16. Bishop J.F. Lowenthal R.M. et.al. Etoposide in Acute Nonlymphocytic Leukemia. *Blood* 1990;75:27-32.
17. Bodine D M, Crosier P S, and Clark S C. *Effects of Hematopoietic Growth Factors on the Survival of Primitive Stem Cells in Liquid Suspension Culture*. *Blood* 1991; 78(4) 914-920.
18. Boogaerts M.A.; Van Putten W.; et.al. Short and High Dose of Lenograstim Permits Peripheral Blood Progenitor Cell Collection (PBPC) in Patients with AML. *Blood* 1995;86(10): supplement 3910.
19. Bosco M C, Espinoza I, et.al. *Regulation by Interleukin-2 (IL-2) and Interferon γ of IL-2 Receptor γ Chain Gene Expression in Human Monocytes*. *Blood* 1994; 83 (10):2995-3002.
20. Bosgg R. Dane. *El Leucocito*. Tr.1; México: El manual moderno, 1985. 131 p.
21. Bourantas KL; Tsiara S; Christou L. et.al. *Treatment of 34 patients with Myelodysplastic syndromes with 13-CIS Retinoic Acid*. *Eur-J- Haematol* 1995; 55(4) : 235-239.
22. Brand J.E, Srour E.F, et. al. *Characterization the of Human Hematopoietic Stem Cells. Humans*. *Progress in Clinical and Biology Research*. 1990; 325:29-36.
23. Brandt J.; A. Robert et.al. *Role of c-kit Ligand in the Expansion of Human Hematopoietic Progenitor Cell*. *Blood* 1992; 79(3):634-641.
24. Brown, Barbara A. *Técnicas de Laboratorio en Hematología*. España: Elicien, c1976. 346 p.
25. Bruce, Alberts. *Biología Molecular de la Célula*. Tr. 2; España: Ediciones Omega, 1990. 1232 p.
26. Burgaleta C. *Leucemia Mielomonocítica Crónica Comportamiento in vitro de una Entidad con Personalidad Propia*. *Sangre* 1981; 26(3):276-282.

27. Calavia J.; Alsar M.J.; et.al. *Efecto Modulador del GM-CSF Sobre la Función Celular AK y la Secreción de TNF y de IFN- α su Posible Repercusión Sobre la Recuperación Granulocitaria de Pacientes con LMA Sometidos a TMO Autólogo.* Sangre 1991; 36 supl (3):76-81.
28. Calderón Jesús. *Citocinas y su Influencia en el Sistema Inmune.* Bioquímica 1993;18(2):99.
29. Caldwell ,Jerry and Stephen, G. Emerson. *IL-1 α and TNF α Act Synergistically to Stimulate Production of Myeloid Colony-Stimulating Factors by Cultured Human Bone Marrow Stromal Cells and Cloned Stromal Cell Strains.* J. Cell Physiol. 1994; 159 : 221-226.
30. Capizzi, R. L. et. al. *Protección Hematológica Frente a la Quimioterapia Antineoplásica Mediante la Amifostina.* Rev. Cáncer 1995; 9(1): 16-22.
31. Caux Ch., Favre C., et.al. *Potential of Early Hematopoiesis by Tumor Necrosis Factor- α Is Followed by Inhibition of Granulopoietic Differentiation and Proliferation.* Blood 1991; 78 (3) : 635-644.
32. Celis, Julio E. *Cell Biology.* U.S.A.: Academic Press, c1994. 3 vol. 683 p.
33. Chervenick P; Boggs D. R. *In Vitro Growth of Granulocytic and Mononuclear Cell Colonies from Blood of Normal Individuals.* Blood 1971; 37(2): 131-135.
34. Ciscar, R. Federico, Farreiras V. Pedro. *Diagnóstico Hematológico (Laboratorio y Clínica)* 3ed. España: JIMS Barcelona, c1972. 1 Vol. 973 p.
35. Clutterbuck, E.J., et.al. *Regulates the Production of Eosinophils in Human Bone Marrow Culture: Comparison and Interaction With IL-1, IL-3, IL-6, and GMCSF.* Blood 1989; 73:1504-1512.
36. Cocita B. G; Golde D. W. et.al. *Identification and Characterization of a Low-Affinity Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor on Primary and Cultured Human Melanoma Cell.* Blood 1991; 78(3): 609-615.
37. Conde E., Iriondo A., et.al. *Allogeneic Bone Marrow Transplantation Versus Intensification Chemotherapy for Acute Myelogenous Leukaemia in First Remission: a Prospective Controlled Trial.* British J. Haematol. 1988; 68: 219-226.
38. De Diego J.; López H.M.; et.al. *Transplante de Medula Osea Alogénico en el Servicio de Hematología del Hospital Regional "20de noviembre" ISSSTE.* Sangre 1993;38(1-3) :87.
39. De la Rubia; Sanz M.A. *Técnicas para la Movilización y Recolección de Células Hematopoyéticas Circulantes.* Sangre 1991;36 Supl (3):181-184.

40. Del Cañizo M.C.;Almeida J.;San Miguel J.F. *La Célula Clonogénica en la Leucemia Aguda Mieloblástica*.Sangre 1990,35(2):125-127.
41. Demetri, George D. and James D. Griffin. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor and its receptor*. Blood 1991; 78(11): 2791-2808.
42. Devine Steven. et.al. *TAMO de Donador no Relacionado: Actualización Clínica*. Contemporary Oncology. México, D.F. 1996 2(3): 13-20.
43. Dexter, T.M. *Conditions Controlling the Proliferation of Hemopoietic on Cells in Vitro*. *Cell Physiol*. 1977; 81:335-344.
44. Dinnebier M; Vogel SG ; et.al. *Detection of BCR/BCL Transcripts in CML Patients Within Four Hours by Means of mRNA Extraction Directly from Whole Blood and one-Tube Nested RT-PCR*.Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1995 (supplement 478).
45. Dongen van J.J.M, Bruijn de M.A.C. et.al. *Detección of Mimimal Residual Disease in Acute Leukemia*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1995; 55 (Suplement-23).
46. Dooley DC Oppenlander BK. et al. *Basic Fibroblast Growth Factor and Epidermal Growth Factor Downmodulate the Growth of Hematopoietic Cells in Long-Term Stromal Cultures*. J. Cell Physiol.1995; 165(2): 386-397.
47. Elliot Y MJ. et.al. *Recombinant Human Interleukin-3 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Show Common Biological Effect and Binding Characteristics on Human Monocytes*. Blood 1989; 74: 249-2359.
48. Espadaler M.;Aventin A.et.al. *Identificación de Cromosomas Marcadores y Translocaciones Cromosómicas Complejas, Mediante Hibridación in situ no Radioactiva, en Hemopatías Malignas*.Sangre 1994;39(5)383-387.
49. Fauser A. A., Messner H. A. *Granulopoietic Colonies in Human Bone Marrow Peripheral Blood and Cord Blood*. Blood 1978; 52: 1243-1247.
50. Feliu E. y Rozman C. *Aspectos Ultraestructurales de la Dishempoyesis en los Síndromes Mielodisplásicos Adquiridos*. Sangre 1985; 30(4C): 651-668.
51. Firkin Frank; Birner Raquella; et. al. *Differential Action of Diffusible Molecules in Long-Term Marrow Culture on Proliferation of Leukaemic and Normal Haemopoietic Cells*. Br. Jou. Haematol. 1993; 84: 8-15.
52. Florensa L. et.al. *Aplicación del Cultivo "in vitro" de las Células Formadoras de Colonias Granulomonocíticas (CFC- GM) de la Médula Osea en el Estudio de las Anemias Refractarias*. Sangre 1984; 29(3): 252-258.

53. Florensa, L., Woessner, R. et al. *Valor del cultivo "in vitro" de las células germinales granulomonocíticas (CFU-GM) en los síndromes mielodisplásicos.* Sangre 1985; 30(4c):689-697.
54. Florensa, Brichs L. et al. *Cultivos Celulares <<in vitro>> de la Leucemia Aguda.* Sangre 1981; 26(5-B): 783-803.
55. Flores R.G. *Receptores Celulares.* F.E.S.C.-U.N.A.M. 1997, 1-7.
56. Fung H; Sheperd J. D. et al. *Acute Monocytic Leukemia: a Single Institution Experience.* leuk. Lymphoma 1995; 19(3-4):259-265.
57. Furth van Ralph. *Hemopoietic Growth Factors and Mononuclear Phagocytes.* Switzerland. Karger, c1993. 222 p.
58. Gale Robert P. *Manual de Oncología Clínica.* México, D.F.: Limusa, c1986 200 p.
59. Galende J, Rodriguez M.J., et al. *Influence of hematopoietic Growth Factors on Transfusion Support Following Autologous Bone Marrow Transplantation.* Sangre 1995; 40(4):281-287.
60. Gallagher A.; Padua R.A. et al. *Aberrant Expression of p21RAS But Not p120GAP is a Common Feature of Myelodysplasia.* Leukemia 1995;9(11):1833-1840.
61. Gallin J Y, Goldstein J M y Snyderman R. *Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates.* 2 ed.; New York: Raven Press, Ltd., c1992. 1500 p.
62. García, M. et al. *Cultivo de células formadoras de colonias granulomonocíticas de médula ósea (CFU-GM) en síndromes mielodisplásicos y su relación con los hallazgos hematológicos y subtipo FAB.* Sangre 1991; 36(4): 269-275.
63. Geissler K, Öhler L. et al. *Inhibitory Effect of Interleukin-10 on the Autonomous in Vitro Growth of Chronic Myelomonocytic Leukemia Cells.* Blood 1996; 86(10)suplement 2645.
64. Geller R.B.; Burke P.J. et al. *A two -Step Time Sequential Treatment for Acute Myelocytic Leukemia.* Blood 1989; 74:1449-1506.
65. Gimble J M, Morgan C, et al. *Bone Morphogenetic Proteins Inhibit Adipocyte Differentiation by Bone Marrow Stromal Cells.* J.Cell. Biochem. 1995; 58(3):393-402.
66. Giralt M., Rubio-Felix D., et al. *Semiología Clínica, Evolución y Terapéutica de los Síndromes Mielodisplásicos.* Sangre 1985; 30(4C):705-712.

67. Goldman John M. *A Special Report: Bone Marrow Transplants Using Volunteer Donors-Recommendations and Requireriments for a Standardizet Practice Throughout the World 1994 Update.* Blood 1994; 84(9): 2833-2839.
68. Gollner G, Aman M J, et.al. *Interferon-alpha (TNF-alpha) Inhibits Granulocyte- Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Expression at the Post-Transcriptional Level in Murine Bone Marrow Stromal Cells.* Br.J.Haematol. 1995; 91(1):8-14.
69. Gómez de la C E, Viñuela J E, Herrera J G. *Bases Celulares de la Respuesta Inmune.* Tratado de Medicina Práctica, Medicine.1988; 47: 2985-2998.
70. Grañena, A.; Roszam, C. et.al. *Trasplante de Médula Osea en la Leucemia Aguda.* Sangre1981; 26(5B):901-918.
71. Gray J.W. *Molecular Cytogenectics: a Review of the Genome.* Scand. J. Clin. Lab.Invest 1995;55(Suplement-44).
72. Greenberg P; Fenaux P; et.al. *International Workshop Consensus Risk Analysis System for Mielodysplastic Syndromes (MDS).* Blood 1995;86(9) (abstracs 1065).
73. Grosh, William W. y Quesenberry, Peter J. *Recombinant Human Hematopoietic Growth Factors in the Treatment of Cytopenias.* Clin.Immunology and Immunopath. 1992; 62(1): 825-838.
74. Guinan E.C. López K.D. et.al. *Experience With Granulocyte-Marophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) in Children With Pancytopenia.* Pediatric Research 1992; 31(4/P.2):140A.(abs 828).
75. Hall, Roger and Malia, G. R. *Medical Laboratory Haematology.* 2 ed. Oxford: Butterworth Heinemann, c1991. 712 p.
76. Hall Cecil E. *Microscopía Electrónica.* Tr.1; España: Urmo, c1970. 440 p.
77. Hall P.D.; Benka H. et.al. *The Influence of Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 Concentrations on Nonhematologic Toxicity and Hematologic Recovery in Patients With Acute Myelogenous Leukemia.* Exp. Hematol. 1995; 23(12):1256-1260.
78. Han Z. C., Bellucci S, et.al. *Glycosaminoglycans Enhance Megakaryocytopoyesis by Modifying the Activities of Hematopoietic Growth Regulators.* J. Cell. Physiology. 1986; 108: 97-104.
79. Hassan H.T. *Interferon- α Enhances the Cytotoxic and Cytostatic Activities of Chemotherapeutic Drugs in Human Myeloid Leukemia Cells.* J. Interferon and Cytokine Research 1996 16:139-146.

80. Hebbar M; Hebbar Savean K. et.al. *Systematic Siseases in Myelodysolasic Syndromes*. Rev. Md. Interne. 1995; 16(2) : 897-904.
81. Henry, John B. *Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio*. 8ed. España: Salvat, c1988. 2 Vols. 1870 p.
82. Henschler R.;Brugger W. et.al. *Maintenance of Transplantation Potential in Ex Vivo Expanded CD34(+)-Selected Human Peripheral Blood Progenitor Cells*. Blood 1994;84(9):2898-2903.
83. Henschler R.;Strobel E.S.et.al. *Extracellular Matrix Proteins Promote Migration of Primitive Hematopoietic Cells in Synergy With Colony Stimulating Factors Through and Integrin-Dependent*. Blood 1995;86 (suplement 91).
84. Hernández, Velez A. et.al. *Fundamentos de Medicina*. 4de. Colombia: Cooperación para Investigaciones Biológicas ,1992 490 p.
85. Hernández N.L., Florensa L., et.al. *Hematopoyesis: Bases Anatomofuncionales y Exploración Clínica*. Tratado de Medicina Practica (Medicine) 1989; 9:493-505.
86. Hernandez, Bronchud Miguel. *Manual Molecular del Cáncer*. España: MCR, c1992. 140 p.
87. Hernández N. L., Brito B. M. L., et. al. *Biopsia Medular en el Estudio de los Síndromes Mielodisplásicos*. Sangre 1985; 30(4C):680-688.
88. Hyun B.H. et.al. *Fundamentals of Bone Marrow Examination*. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 1994; 8(4):641-646.
89. Iscove N.N; Senn J:S; et.al. . *Colony Formation by Normal and Leukemia Human Marrow Cells in Culture: Effect of Conditioned Medium From Human Leukocytes* Blood 1971; 37(1): 1-5.(414).
90. Ihalainen J; Antttila P; et. al. *Increased DNA-Methylation at Calcitonin a Gene 5'Area in Myelodisplasia and Early Hematopoietic Dysplasia of Elderly*. Blood 1995 86 (suplement 1070).
91. Jackson H, Williams N, Westcott K R and Green R. *Differential Effects of Transforming Growth Factor- β 1 on Distinct Developmental Stages of Murine Murine Megakaryocytopoiesis*. J. Cell. Physiol.1994; 161: 312-318.
92. Jackson H.; Williams N.; et.al. *Differential Effects of Transforming Growth Factor-beta1 on Distinct Development Stages of Murine Megakaryocytopoiesis*. J.Cell. Physiology 1994,161(2): 312-318.
93. Jacobsen E W, and Keller J R, et.al. *Bidirectional Effects of Transforming Growth Factor-Induced Human Myelopoiesis in vitro: Differential Effects of Distinct TGF- β Isoforms*. Blood 1991; 78 (9): 2239-2247.

94. Jaulmes, Ch. y Jude, A. *Práctica de Laboratorio*. 2ed. España: Masson, c1972, 1112 p.
95. Keating M.J; Kantarjian H. et.al. *Response to Salvage Therapy and Survival After Relapse in Acute Myelogenous Leukemia*. J. Clin. Oncol. 1989;7:1071-1080.
96. Keller U, Aman M J, et.al. *Human Interleukin-4 Enhances Stroma Cell-Dependent Hematopoiesis: Costimulation With Stem Cell Factor*. Blood 1994; 84(7): 2189-2196.
97. Khoen, Elli. *Cell Structure and function by Microspectrofluorometry*. USA: Academic Press, c1989. 675 p.
98. Kishi K, Ellingsworth Lr, et. al. *The Suppressive Effects of Type β Transforming Factor (TGF β) on Primitive Murine Hemopoietic Progenitors Are Abrogated by Interleukin-6 and Granulocyte Colony-Stimulating Factor*. Leukemia 1989; 3:687- 691.
99. Kobayashi Masanobu; Imamura M; et.al. *Synergistic Effects of Interleukin-3 on the Expansion of Human Hematopoietic Progenitor Cells in Liquid Cultures*. Blood 1991 ; 78 (8) : 1947-1953.
100. Koenigsmann Michael, Griffin James D. et al. *Myeloid and Erythroid progenitor Cells from Normal Bone Marrow Adhere to Collagen type Y*. Blood 1992; 79(3): 657-665.
101. Koller MR; Bradley MS; Palsson BD. *Growth factor Consumption and production in perfusion cultures of human bone marrow correlate with specific cell production*. Exp.Hematol. 1995; 23(12): 125-128.
102. Lackey D.A.; Hillyer C.D. et.al. *Colony-Forming Unit Culture of Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cells: Comparison of Commercially Available Media*. J.Hematother.1992;1(3):289-292.
103. Lamana, M. fernández-Rañada, J.M^º. *Un Método Simple para Detectar Progenitores Inmaduros Después de un Tratamiento in vitro de Médula Osea con ASTA-Z 7654*. Sangre 1991; 36(6): 501-504.
104. Las Heras G., Ribera J. M., et.al. *Infiltración Cutánea Diseminada Como Primera Manifestación de una Leucemia Mielomonocítica Crónica*. Sangre 1990; 35(3):142-146.
105. Lazarus H.M; Vogler W.R. et.al. *High-Dose Cytosine Arabinósido and Daunorubicin as Primary Therapy in Elderly Patients With Acute Myelogenous Leukemias: A Phase I-II Study of the Southeastern Cancer Study Group*. Cancer 1989;63:1055-1059.

106. Lee, Frank. *Growth Factors Controlling the Development of Hemopoietic Cells*. Progress in Clinical and Biology Research. 1990; 325: 385-390.
107. Lee Gordon Benjamin. *Lo Esencial de la Inmunología*. México : El Manual Moderno, c1974. 288p.
108. Leeuwen van J.E.; Tol van M.J. et.al. *Persistence of Host-Type Hematopoiesis After Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Leukemia Is Significantly Related to the Recipient's Age and/or the Conditioning Regimen, But it Is Not Associated With an Increased Risk of Relapse*. Blood 1994;83(10):3059-3067.
109. Lei KI; Liew CT. et.al. *Acute Monoblastic Leukaemia with Conjunctival Tumours*. Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. 1995; 7(6):405-406.
110. Leon E; Midori K; et.al. *Infecciones en Trasplantes de Medula Osea Alogenico Experiencia del Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán"*. Sangre 1993 38(1-3): 87. 348
111. Lesson S.Thomas. *Histología*. 4ed. México, D.F. : Interamericana, c1984. 602 p.
112. Ljungman Per, de Witte T., et. al. *Bone Marrow Transplantation for Acute Myeloblastic Leukaemia: an EBMT Leukaemia Working Party Prospective Analysis from HLA-typing*. British J. haematol. 1993; 84:61-66.
113. Löffler H; Gassmann W. et.al. *Eosinophilia and AML M4Eo: Diagnostic and Clinical Aspects*. Leuk-Lymphoma. 1995;18 suppl 1:61-63.
114. López A.F. and Cawley J.C.. *Late B Cells Express Receptors From GM-CSF, and the Cytokine Inhibits B-cells Movement*. Blood 1996 (Supplement 90).
115. Löwenberg B; Zittoun R. et.al. *Study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group*. J.Clin.Oncol 1989; 7:1268-1274.
116. Lowenthal R.M.; Sullivan S.A. *G-CSF-Estimulated Bone Marrow (BM) Harvests to Obtain Sufficient Stem Cells for Autologo Transplantation from Extensivel y, Pre-Treated Patients*. Blood 1995;86(10): supplement 3936.
117. Marché, Cova Alejandro et.al. *Mantenimiento y Diferenciación de Células Tronco Hematopoyéticas en Cultivo Líquido sin Factores Estimulantes*. Bioquímica 1995; 20(Nº especial): 59. (Simposium).
118. Marijt W.A.F., Veenhof W.f.j., et.al. *Minor Histocompatibility Antigens HA-1,-2, and -4-, and HY-Specific Cytotoxic T-Cell Clones Inhibit Human Hematopoietic Progenitor Cell Growth by a Mechanism That Is Dependent on Direct Cell-Cell Contact*. Blood 1993; 82(12):3778-3785.

119. Martín, Villa M. et al. *Sistema HLA y Trasplante*. Tratado de Medicina Práctica (Medicine) 1988; 47: 3011-3020.
120. Marukawua O; Akao Y. et.al. *Molecular cloning of the breakpoint of t(11;22) (q23;q11) chromosome translocation in an adult acute myelomonocytic leukaemia*. Br.H. Haematol. 1996; 92(3):687-691.
121. Matsumura I, Kituyama H, et.al. *Functional Role of Thrombopoietin in the Abnormal Growth of Acute Myeloblastic*. Blood 1995; 86(10):supplement 68.
122. Mayani, Hector; Salcedo, Mauricio et. al. *Aspectos Moleculares de la hematopoyesis*. *Investigación Clínica* 1997; 49(suplemento 1): 42-48.
123. Mayani H, López O, Santos J H. *Citocinas: Moduladores de la Hematopoyesis y la Respuesta Inmune*. *Investigación Clínica* 1997; jul-sep: 4-5 p.
124. Mayani H; Dragowska W. et.al. *Charaterization of Funcionally Distinct Subpopulations of CD34⁺Cord Blood Cells in Serum-Free Long-Term Cultures Supplemented With Hematopoietic Cytokines*. Blood 1993; 82(9): 2664-2672.
125. Mazza Joseph J. *Manual de Hematología Clínica*. Tr. 1; España: Salvat, c1990. 700 p.
126. *Memorias Terceras Jornadas de Químicos Clínicos de la Región Siglo XXI*. IMSS noviembre 1997.
127. Mendoza J F, López R, et.al. *Los Factores Estimuladores de Colonias (CSFs) y las Interleucinas (ILs)*. Sangre 1993; 38(4): 309-322.
128. Merino A., Urbano A., et.al. *Estudio Inmunofenotípico de las Fracciones Medulares Obtenidas Mediante Elutriación en el Transplante Alogénico de Médula Osea*. Sangre 1993; 38(5):359-364.
129. Miale, Jhon B. *Hematología (Medicina de Laboratorio)* 6ed. España: Reverte, 1985. 1168 p.
130. Miniero R. Madon E. et.al. *Acute Pulmonary Failure After the Firts Administration of Recombinant Human Granulocyte- Macrophage Colony-Stimulating Factor*. Leukemia 1992;6:352-353.
131. Moore, Malcolm A.S. *Clinical Implications of Positive and Negative Hematopoietic Stem Cell Regulators*. Blood 1991; 78(1): 1-19.

132. Morales Gazca, Maria Elena. *Estudio Citoquímico Durante Hematopoyesis en Cultivo Líquido de Células Progenitoras de Médula Osea Movilizadas a la Sangre*. Tesis de Licenciatura en Biología; México D.F. : Facultad de Ciencias, U.N.A.M., c1996. 92 p.
133. Moreno Rodriguez. *Bases Celulares y Moleculares del Crecimiento Inmunológico*. Bioquímica 1993;18(2):99.
134. Morschhauser F; Wattel E; et. al. *Glomerular Injury in Chronic Myelomonocytic Leukemia*. Leuk- Lymphoma 1995; 18(5-6): 479-483.
135. Muench, Marcos O. Copp, James Polakoff, Josephine et.al. *Expresión de CD33, CD38, and HLA-DR on CD34⁺ Human Fetal Liver Progenitors With a High Proliferative Potential*. Blood 1994; 83(11): 3170-3181.
136. Muller de Soyano A., Travieso B. et.al. *Leucemias agudas: Diagnóstico Morfológico, Citoquímico e Inmunofenotípico*. Sangre 1993;38(1-3) Suplemento A-12.
137. Murphy, Martin J. *Blood Cell Growth Factors: Their Present and Future use in Hematology and Oncology*. Symposium Beijing ,China: Alfa Medical Press c 1991. 236 p.
138. Murray E W, Pihl C, et. al. *Evidence for the Ligand Independent Cell Surface Expression of the Soluble GM-CSF Receptor α Subunit*. Blood 1995; 86(10):supplement 88.
139. Nakayama H. et. al. *Chronic myelomonocytic Leukaemia with t(8;9) (p11;q34) in Childhood: an example of the 8p11 Myeloproliferative disorder?*. Br.J. Haematol. 1996; 92(3): 692-695.
140. Nathan, David G. *Clinica Hematológica*. Tr.1; España: Salvat, 1985 11(3): 678 p.
141. Nissen C. Filipowitz W., et.al. *Persistent Growth Impairment of Bone Marrow Stroma After Antilymphocyte Globulin Treatment for Severe Aplastic Anaemia and its Association With Relapse*. Eur. J. Haematol. 1995; 55(4): 255-261.
142. Ogata K, Tamura H, et. al. *Effects of Interleukin-12 on Natural Killer Cell Cytotoxicity and the Production of Interferon- γ and Tumour Necrosis Factor- α in Patients With Myelodysplastic Syndromes*. British J. Haemat. 1995; 90: 15-21.
143. Ortiz-Bonilla B. et. al. *Efectos de Quimioterápicos Antineoplásicos en la Proliferación Celular, Formación de Rosetas EA y EAC Cultivos Celulares de Sangre Periférica de Pacientes con Leucemia Linfoblástica y Monoblástica*. Bioquímica 1991; 16(62):20-25.

144. Ovilla M.R.; Rubio B.E. et.al. *Reaccion Injerto Contra Leucemia (RICL) en Leucemia Aguda Después del Trasplante de Médula Osea (TMO)*. Sangre 1993; 38(1-3):87.
145. Papadhimitriou SI; Abazis D; et.al. *An Unusual Cytogenetic Abnormality involving Chromosomes 1 and 7 in a Case of Chronic Myelomonocytic Leukemia*. Cancer Genet. Cytogenet. 1995; 85(1): 75-77.
146. Park, Linda S. and Gillis Steven. *Characterization of Hematopoietic Growth factor Receptors*. Progress in Clinical and Biology Research. 1990; 325: 189-196.
147. Paul Jhon *Cell and Tissue Culture*. Great Britain: Churchill Livingstone, c1970. 430 p.
148. Pavlov A. *Erythropoietin: Physiology and Biochemistry Scand.* J. Clin. Invest. 1995;(supplement. 411).
149. Peault In B. *In Vitro Models of Stroma-Dependent Lymphopoiesis*. Semin.Immunol. 1995; 7(3): 169-175.)
150. Perez, Tamayo Ruy. *Introducción a la Patología. Mecanismos de la Enfermedad*. 2ed. México, D.F. :Panamericana, c1991. 900 p.
151. Pierelli, Luca Teofili, Luciana Menichella, Glacomo et.al. *Further Investigations on the Expression of HLA-DR CD33 and CD13 Surface Antigens in Purified Bone Marrow and Peripheral Blood CD34+ Haematopoietic Progenitor Cells*. British J. Haemat. 1993; 84: 24-30.
152. Pike B.L.; Robinsdon W.A. *Colony Growth of Human Bone Marrow Cells In Vitro*. J. Cell Physiol 1970; 76: 77-81.
153. Plasencia-Mota A.P. et. al. *Leucemias agudas no linfoides*. Tratado de Medicina Práctica (Medicine) 1989; 8: 444-449.
154. Pojda Z.; Dexter T.M.; et.al. *Production of Multipotential Cell (CFU-S) Proliferation Inhibitor by Various Populations of Mouse and Human Macrophages*. British J. Haematol. 1988; 68:151-157.
155. Ponchio L.; Conneally E.; Eaves C. *Quantitation of the quiescent fraction of Long Term Culture Initiating Cells in Normal Human Blood and Marrow and the Kinetics of their Growth Factor-Stimulated Entry Into S-Phase in vitro*. Blood 1995; 86(9) : 3314-3321.
156. Porto B., Mota A., *Estudio Citogenéticos en Enfermedades Hematológicas*. Sangre 1992; 388(2):103-115.
157. Prieto F., Carbonell F., et.al. *Citogenética en el Estudio de los Síndromes Mielodisplásicos*. Sangre 1985; 30(4C): 689-679.

158. Primer Foro Nacional de Difusión Científica y Educación para la Salud en la Leucemia y los Cánceres más Frecuentes en México. México, D.F. :Dirección de Prestaciones Médicas, c1995. 141 p.
159. Puente, F. Gómez, Casal, et. al. *Cultivos granulopoyéticos in vitro*. Sangre 1993; 38(4):331-334.
160. Pulkki K. *The Diagnostic Use of Proinflammatory Cytokines*. Blood 1996; 45(3)(suplement 181).
161. Quesenberry P J, Srikumar K, et. al. *Stromal Regulati6n of hemopoiesis*. Clinical and Biology Research. 1990; 325:107-114.
162. Quezada P. F. *Producci6n Industrial de Citocinas* Bioquimica 1994; 19 (Sup S-27)
163. Quito F.L.;Beh J. et.al. *Effects of Fibroblast Growth Factor-4 (K-FGF) on Long-Term Cultures of Human Bone Marrow Cells*. Blood 1996;87(4):1282-1291.
164. R. Iran Freshney. *Culture of Animal Cells*. 2 ed. U.S.A.: Wiley-Liss, c1987. 397 p.
165. Rafii, S.; Shapiro F. et.al. *Human Bone Marrow Microvascular Endothelial Cells Support Long-Term Proliferation and Differentiation of Myeloid and Megakaryocytic Progenitors*. Blood 1995; 86(9):3353-3363.
166. Ramirez Rumbo Ma.Eugenia. *Leucemia Promielocitica Aguda*. Tesis de licenciatura en Q.F.B.; Cuautillán, Edo. de Méx. : Facultad de Estudios Superiores Cuautillán, UNAM, 1993. 69 p.
167. Rapoport A P, Luhowskyi S, et.al. *Site-Directed Mutagenesis of the Alpha Subunit of the Human IL-3 Receptor*. Blood 1995; 86(10):suplement 87.
168. Raza Azra. et. al. *Sindromes mielodisplasicos*. AMHC 1996;(Vol,No): p 15-21.
169. Rizzo M.T., Boswell H.S., et.al. *Arachidonic Acid Induces c-jun Gene Expression in Stromal Cells Stimulated by Intereukin-1 and Tumor Necrosis Factor-Alpha: Evidence for a Tyrosine- Kinase-Dependent Process*. Blood 1995; 86 (8): 2967-1975.
170. Rizzoli, V. and Carlo, S. C. *Stem Cell Purging: an Intriguing Dilemma*. Exp. Hematol. 1995; 23(4):296-302.
171. Rogers C.E.;Bradley M.S.et.al.*Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marow Perfusion Cultures: Erythroid Development and Relationship With Burts-Forming Units-Erythroid*. Exp.Hematol.1996;24(5):597-604.

172. Rogers J. A.; Berman J.W. et.al, *TNF-Alpha Inhibits the Further Development of Committed Progenitors While Stimulating Multipotential Progenitors in Mouse Long-Term Bone Marrow Cultures.* J.Immunol.1994;53(10):4694-4703.
173. Rogers, Jimmy A. y Berman, Joan W. *TNF- α Inhibits the Further Development of Committed Progenitors While Stimulating Multipotential Progenitors in Mouse Long-Term Bone Marrow Cultures.* J. of Immunology 1994;153:4694-4703.
174. Rosse FF.; Young NS. ; et. al. *Sección : Trastornos Hipoproliferativos de la Célula Tronco. Investigación Clínica 1997; 49 (suplemento 1) : 83-88.*
175. Rowe Jacob M. et al. *Recommended Guidelines for the Management of Autologous and Allogeneic Bone Marrow Transplantation.* Ann Intern. Med. 1994; 120(2):143-158.
176. Rubio, Felix D. et al. *Análisis de cuatro sistemas de puntuación pronóstica en 197 síndromes mielodisplásicos.* Sangre 1991; 36(6): 463-469.
177. Ruiz-Argüelles Guillermo y San-Miguel, Jesús. *Actualización en Leucemias.* México, D.F. : Panamericana, c1996. 169 p.
178. Sachs, Leo and Lotem Joseph. *Control of Programmed Cell Death in Normal and Leukemic Cells: New Implications for Therapy.* Blood 1993;82(1): 15-21.
179. San Miguel J.F. Hernández J.M. et.al. *Acute leukemia After a Primary Myelodysplastic Syndrome: Immunophenotypic, Genotypic y Clinical Characteristics.* Blood 1991; 78(3):768-774.
180. San-Sabrafen J. et. al. *Hematología Clínica.* 3ed. España: Mosby, c1994. 614 p.
181. Sanchez, Cortés Evelia. et.al. *Sección : Leucemia aguda.* Investigación Clínica 1997; 49(suplemento 1):103-107. (273).
182. Sánchez, Fayos J. et. al. *Síndromes Mielodisplásicos.* Tratado de Medicina Práctica (Medicine) 1989; 8:438-443.
183. Sánchez, Fayos J. et. al. *Panmielopatías Clonales: Introducción.* Tratado de Medicina Práctica (Medicine)1989; 8: 419-423.
184. Sanchez F. J.;Outeiriño J. et.al. *Citodinámica de los Precursores Mieloides (Eritroblastos y Granulocitos Divisibles) en los Síndromes Mielodisplásicos.* Sangre 1985; 30(4C):705-712.
185. Sanchez Fayos J., Pérez Rus G., et.al. *Los Síndromes Mielodisplásicos Como Estados Preleucémicos.* Sangre 1987; 32(6):715-730.

186. Sans-Sabrafen J. y Woessner S. *Síndromes mielodisplásicos*. Sangre 1985;30(4C): 633-637.
187. Santos George *Bone Marrow Transplantation*. Year Book USA. . Mosby c1991. 181-193.
188. Sanz G.F.; de la Rubia J.; et. al. *Autotrasplante de células hematopoyéticas progenitoras de circulantes en leucemia mieloblástica aguda en primera remisión*. Sangre 1991; 36 supl 3: 189-193.
189. Sandoz de Mexico S. A. *LEUKOMAX Sandoz 1997 25 p.*
190. Sato N, Sawada K, et.al. *Purification of Human Marrow Progenitor Cells and Demostration of the Direct Action of Macrophage Colony-Stimulating Factor on Colony- Forming Unit-Macrophage*. Blood 1991; 78 (4): 967-974.
191. Schweitzer C.M. et.al. *Isolation and Culture of Human Bone Marrow Endothelial Cells*. Exp. Hematol 1995; 23(1): 41-48.
192. Shabo Lotern J. L. Sachs. *Regulation of Megakaryocyte Development by Interleukin-6*. Blood 1989; 74: 1545-1551.
193. Scherer S.W.; Osborne L.; et. al. *Molecular Definition of a Narrow Interval AT Tq22,1 Associated with Myelodisplasia*. Blood 1995; 86 (supplement. 1067).
194. Shibata Y, Bjorkman D R, et.al. *Macrophage Colony-Stimulating Factor-Induced Bone Marrow Macrophages Do Not Synthesize or Release Prostaglandin E₂* Blood 1994; 83(11). 3316-3323.
195. Simmons P.J, and Torok-Storb B. *Identification of Stromal Cell Precursors in Human Bone Marrow by a Novel Monoclonal Antibody, STRO-1*. Blood 1991; 78 (1): 55-62.
196. Soler M.A. et.al. *Técnicas para la Criopreservación e Infusión de Células Hematopoyéticas Circulantes*. Sangre 1995; 16(5)186-189.
197. Soligo D.A.; Campiglio S.et.al. *Response of Myelodysplastic Syndrome Marow Progenitor Cells to Stimulation With Cytokine Combinations in a Stroma-Free Long-Term Culture System*. B.J.Haematol.1996;92(3): 548-558.
198. Sonnewith, Alex C. et.al. *Diagnóstico Clínico*. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana, c1983. 1300 p.
199. Sonoda Y, Tanimukai S, et. al. *Hematopoietic Actions of Recombinant Human MPL-Ligand on Highly Purified CD34+ Blood Progenitors*. Blood 1995; 86(10):supplement 67.

200. Sosa Sánchez Ricardo. et al. *Sección: Trasplante de Médula Osea. Investigación Clínica 1997*; 49(suplemento 1): 75-82.
201. Stamatoyanno, Pouls George, et. al. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. 2ed. Philadelphia: G.W. Saunders Company, 1994. 1800 p.
202. Staroslawska P., Filipezak P., et.al. *The Effects of Irradiation and Venoruton on α TNF Concentration in the Blood Serum of Rats. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1995;(supplement. 412).*
203. Strobl H; Takimoto M; et.al. *Myeloperoxidase Expression in CD34⁺ Normal Human Hematopoietic Cells. Blood 1993;82(7): 2069-2078.*
204. Tavassoli M, Hurdy Ch L, et.al. *Molecular Mechanism of hematopoietic stem cell binding to the supportive stroma. Progress in Clinical and Biology Research. 1990; 325: 87-96.*
205. Teshima Takanori; Harada Mine, et.al. *Granulocyte Colony -Stimulating Factor (G-CSF)-Induced Mobilization of Circulating Haemopoietic Stem Cells. British J Haematol. 1993; 84:570-573.*
206. Tien H.F; Wang C.-H-et.al. *Correlation of Cytogenetic Results With Immunophenotype, Genotype, Clinical Features, and ras Mutation in Acute Myeloid Leukemia. A Study of 235 Chinese Patients in Taiwan. Cancer.Genet. Cytogenet. 1995;84(1):60-68.*
207. Tomás J.F.; Figueroa A.; et.al. *Factores Pronósticos en el Trasplante de Médula Osea. Sangre 1991; 36 supl(3):108-111.*
208. Torok L; Simon G. et.al. *Scedosporium Apiospermum Infection Imitating Lymphocutaneous Sporotrichosis in a Patient with Myeloblastic-Monocytic Leukaemia. Br.J. Dermatol. 1995;133(5):805-809.*
209. Torres A. et. al. *Descripción de un Nuevo Método para Tinción Total de Cultivo de Colonias Granulocito-Macrofagos (CFC-GM) en Agar. Sangre 1981; 26(2): 187-189.*
210. Torres A., Martínez G., et.al. *Conceptos Actuales de la Etiopatogenia de las Leucemias Agudas. Sangre 1981; 26(5B):700-717.*
211. Tovar de R.E.; Müller de S.A. et.al. *Clasificación Morfológica y Citoquímica de las Leucemias en el Centro de Quimioterapia Oncológica y Hematológica (CQOH) (Centro Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Leucemias y Linfomas-M.S.A.S.) Sangre 1993;38 (1-3)Suplemento A-11.*
212. Treleaven J.G. et.al. *Bone Marrow and Peripheral Blood Stem Cell Harvesting. J. Hematother 1992; 1(3): 215-223.*

213. Tzvetkova T, Pavlo P. et.al. *Selection of an Apropiate Panel for Immunophenotyping of Cells in Acute Leukemias*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1995;55(Suplement-488).
214. Ulich T L, del Castillo J, et.al. *Hematologic Effects of Stem Cell Factor In Vivo and In Vitro in Rodents*. Blood 1991;78(3):645-654.
215. Ulich T. R., del Castillo J., et.al.. *Stem Cell Factor in Combination with Granulocyte Colony-Stimulating Factor (CSF) or Granulocyte-Macrophage CSF Synergistically Increases Granulopoiesis In Vivo*. Blood 1991; 78 (8) : 1954-1962.
216. Van Furth, Ralph. *Mononuclear Phagocytes*. Great Britain: Black Well Scientific Publications, c1975. 1062 p.
217. Van Furth, Ralph. *Mononuclear Phagocytes :Biology of Monocytes and Macrophages*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers., c1992 pp 465.
218. Verdonck L. F., Dekker a.W., et.al. *Allogeneic Bone Marrow Transplantation With a Fixed Low Number of T Cells in the Marrow Graft*. Blood 1994; 83(10):3090-3096.
219. Villegas A, Guerra J L, et.al. *Morfología y citoquímica en el diagnóstico de los Síndromes Mielodisplásicos*. Sangre 1985; 30(4C):630-650.
220. Wang T.Y.; Brennan J.K.et.al. *Multilineal Hematopoiesis in a Three-Dimensional Murine Long-Term Bone Marrow Culture*. Exp. Hematol. 1995;23(1):26-32.
221. Wang Ch Q, Udupa K B, et. al. *Evidence Suggesting a Stimulatory Role for Interleukin-10 in Erythropoiesis In Vitro*. J. Cell. Physiol. 1996; 166: 305-310.
222. Wardrop C A, Holland B M. *Recombinant Haemopoietic Growth Factors in the Newborn-Will They be Useful?*. Eur.J. Pediatr. 1995;154 (8 Suppl 3):S13-4.
223. Weinthal J.; Rosen Feld C.; et.al. *High Dose G-CSF Stem Cell Mobilization of Normal Donors: Efficacy, Toxicity, and Immunophenotypic Correlation With Age and Sex*. Blood 1995;86(10): supplement 3959.
224. Whicher J.T. *Cytokines: Diagnostic and Clinical Aspects*.Scand. J. Clin.Lab.Invest. 1995 (supplement. 180).
225. Wickenhauser C, Lorenzen J, et. al. *Secretion of Cytokines (Interleukins-1 α , - 3, and -6 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) by Normal Human Bone Marrow Megakaryocytes*. Blood 1995; 85 (3): 685-691.

226. Wiedemann M; Morgan G.J; Allen P.B. BCR-ABL Oncogene in Chronic an Acute Leukemia *Bioquimia* 1995; 15(2): 226-227.
227. Williams M.A. ; Kelsy S.M.; et.al. *Administration of rHuGM-CSF Activates Monocyte Reactive Oxygen Species Secretion and Adhesion Molecule Expression in Vivo in Patients Following High-dose Chemotherapy.* B.J.Haematol. 1995; 90:31-40.
228. Williams, Wiliam J. *Hematology*. 4 ed. USA: McGraw-Hill, c1990. 1882 p.
229. Williams, William J. *Hematologia*. 2ed. España: Salvat, c1983. 2 vol. 1750 p.
230. Wintrobe M.M., et. al. *Clinical Hematology*. Philadelphia : Lea & Febiger, c1994. 1896 p.
231. Woessner S., La fuente R., et.al. *Métodos Inmunocitoenzimáticos: Fundamentos Técnicos y Aplicaciones en el Diagnóstico Hematológico.* Sangre 1987; 32(1):53-66.
232. Wolff SN; Hersing RH; et.al. *High-Dose Cytarabine and Daunorubicin as Consolidation Therapy for Acute Myeloid Leukemia in First Remission: Long-Term Follow-Up and Results* J.Clin Oncol 1989; 7 : 1260-1267.
233. Worth, Arthur . *Histología de HAM*. 9ed; Tr. 1. México: HARLA, c1988. 880p.
234. Yarovinski B. G.; Shtivel Band M.J.;et.al. *Use of the GM-CSF External Chain Peptide Fragment as Colony Stimulating Activityng in CFU-GM-Assay in Vitro.* Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1995;55 (Suplement-414).
235. Zhang Y, Harada A, et.al. *Tumor Necrosis Factor (TNF) is a Physiologic Regulator of Hematopoietic Progenitor Cells: of Early Hematopoietic Progenitor Cells in TNF Receptor p55- Deficient Mice In Vivo and Potent Inhibition of Progenitor Cell Proliferation by TNF Alpha in Vitro.* Blood 1995; 86(8):2930-2937.
236. Zipori, Dov. *Role of Stromal Cell Factors (Restrictins) in Microorganization of Hemopoyetic Tissues.* Clínical and Biology Research. 1990; 325: 115-222.
237. Zittoun R; Jehn U. et.al. *Alternating v Repeated Postremission Treatmen in Adult Acute Myelogenous Leukemia: A Randomized Phase III Study (AML6) of the EORTC Leukemia Cooperative Group.* Blood 1989;73: 896-906.