

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

**“CARACTERIZACION FUNCIONAL DE CELULAS  
PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS EN LEUCEMIA  
MIELOIDE CRONICA”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M. en C. MARIA ANTONIETA CHAVEZ GONZALEZ**

**TUTOR ACADEMICO**

**DR. HECTOR MAYANI VIVEROS**

**México D.F.**

**Enero, 2007.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE GENERAL

I. Resumen	1
II. Abstract	4
III. Introducción	5
IV. Marco Teórico	6
1. Hematopoyesis	
1.1. Características funcionales de las células hematopoyéticas primitivas	6
1.2. Características inmunofenotípicas de las células hematopoyéticas primitivas	8
1.3. Organización estructural del sistema hematopoyetico	11
1.4. Organos y microambiente hematopoyetico	13
1.5. Citocinas que regulan la hematopoyesis	16
2. Leucemia Mieloide Crónica	
2.1. Generalidades	25
2.2. Cromosoma Philadelphia y p210	26
2.3. Opciones terapéuticas en Leucemia Mieloide Crónica	34
2.4. Subpoblaciones Hematopoyéticas en Leucemia Mieloide Crónica	37
2.5. Hematopoyesis después de terapia	39
IV. Planteamiento del problema	43
V. Objetivos	44
VI. Materiales y métodos	
1. Pacientes y obtención de muestras	45
2. Separación de células hematopoyéticas	46
3. Cultivos líquidos	47

4. Inmunocitoquímica	48
5. Cultivos semisólidos	49
6. Expresión del rearreglo Bcr-Abl	
6a) Extracción de ARN	50
6b) Transcripción reversa	51
6c) PCR y PCR anidado	51
6d) Detección de los productos	52
6e) Controles positivos y negativos	53
7. Estadística	53
VII. Resultados y Discusión	
1. Caracterización de las células primitivas de Médula Osea de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica antes de tratamiento	
1.1. Caracterización de la subpoblación CD34+LIN-	54
1.2. Caracterización de la subpoblación CD34+CD38-LIN-	67
1.3. Caracterización de las subpoblaciones CD34+LIN- y CD34+CD38-LIN- en respuesta a TNF $\alpha$	76
2. Caracterización de la subpoblación CD34+LIN- de pacientes que han alcanzado la remisión hematológica	
2.1. Caracterización de la subpoblación CD34+LIN-	96
2.2. Detección de Bcr-Abl en la subpoblación CD34+LIN- de Leucemia Mieloide Crónica.	116
VIII. Discusión General	128
IX. Conclusiones	136
X. Perspectivas	138
XI. Literatura citada	140
XII. Artículos publicados	160

## ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BFU-E	Unidades Formadoras de Brote Eritroide
CCR	Respuesta Citogenética Completa
CFC	Células Formadoras de Colonias
CFU-E	Unidades Formadoras de Colonias Eritroides
CFU-G	Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos
CFU-GM	Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Monocitos
CFU-M	Unidades Formadoras de Colonias de Monocitos
CFU-Mix	Unidades Formadoras de Colonias Mixtas
CFU-S	Unidades Formadoras de Colonias de Bazo
CHR	Remisión Hematológica Completa
CMN	Células Mononucleares
CPH	Células Progenitoras Hematopoyeticas
CTH	Célula Troncal Hematopoyetica
EPO	Eritropoyetina
FIt-3L	Ligando de la Tirosina Fetal 3
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y monocitos
HPP-CFC	Células Formadoras de Colonias con alto potencial hematopoyetico
IFN $\alpha$	Interferón alfa
IL-1	Interleucina 1
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodaltones
LMC	Leucemia Mieloide Crónica

LMC-VT	Leucemia Mieloide Crónica Virgen de Tratamiento
LTC-IC	Células Inicadoras de Cultivos a Largo Plazo
LTMC	Cultivos de Medula Osea a Largo Plazo
M-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Monocitos
MH	Microambiente Hematopoyetico
MON	Médula Osea Normal
ng	nanogramos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Ph	Cromosoma Philadelphia + (positivo) o – (negativo)
PHSC	Células Seminales Hematopoyeticas Pluripotenciales
pb	Pares de bases
RT-PCR	Transcriptasa Reversa de PCR
SCF	Factor de Células Seminales
STI571	Inhibidor de la Trasducción de Señales 571, Imatinib o Gleevec
TCH	Transplante de Células Hematopoyeticas
TGF $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante tipo beta
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TPO	Trombopoyetina

## I. RESUMEN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC), es una enfermedad que se origina a nivel de las células troncales hematopoyéticas teniendo como marcador molecular el cromosoma Philadelphia (Ph) y su producto oncoproteico Bcr-Abl. La consecuencia biológica de ésta alteración es la generación de una progenie incrementada en número que presenta anomalías en las células troncales, progenitoras, y precursores hematopoyéticos con diferentes grados de maduración. Clínicamente la LMC ha sido tratada con diferentes agentes dentro de los que se incluyen: Interferon alfa ( $IFN\alpha$ ), Transplante de Células Hematopoyéticas (TCH), y más recientemente el uso del inhibidor específico de Bcr-Abl, STI571.

En este trabajo se analizó el comportamiento *in-vitro* de muestras provenientes de pacientes con diagnóstico reciente de LMC y que no habían recibido tratamiento previo, así como de pacientes con LMC que habían alcanzado la remisión hematológica después de recibir alguno de los tratamientos antes mencionados. Las muestras vírgenes de tratamiento fueron enriquecidas en dos diferentes subpoblaciones hematopoyéticas. La primera en células CD34+LIN- y la segunda en la subpoblación más primitiva CD34+CD38-LIN-, y en ambas subpoblaciones se evaluó la capacidad de proliferar y expandirse en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas tanto estimuladoras como inhibitoras de la proliferación.

Los resultados demostraron que ambas subpoblaciones celulares tienen alterados sus potenciales de proliferación y expansión en relación con sus contrapartes normales, independientemente de la combinación de citocinas empleadas. Es particularmente relevante que las mayores alteraciones se detectaron en la fracción de células más primitivas CD34+CD38-LIN-.

En las muestras que ya habían recibido algún tipo de tratamiento, solo se obtuvo la subpoblación CD34+LIN- en la que se analizaron sus potenciales de proliferación y expansión, tratando de establecer una correlación con la expresión

del rearrreglo Bcr-Abl, y se encontró que en células provenientes de pacientes tratados con  $IFN\alpha$ , la respuesta es muy similar a la observada a los pacientes que no recibieron tratamiento. Sin embargo, cuando las células provenían de pacientes tratados con TCH se encontró una recuperación hematopoyética, la cual es aún más evidente en células que se obtuvieron de pacientes tratados con STI571. Dicha recuperación parece estar relacionada con el nivel de expresión de Bcr-Abl, ya que en los primeros días de cultivo, la translocación no se encontró en células que recibieron tratamiento con TCH y STI571 *in vivo*. No obstante, después de algunos días en cultivo el rearrreglo se detectó en las células obtenidas de cualquiera de las opciones terapéuticas, aunque hematológicamente los pacientes se comportaron como sujetos sanos.

Estos resultados indican que las células seminales y progenitoras hematopoyéticas provenientes de Leucemia Mieloide Crónica virgen de tratamiento tienen serias alteraciones numéricas y funcionales ya que responden de forma limitada a la estimulación con citocinas. Así mismo, los datos demostraron que las células progenitoras que provenían de pacientes tratados *in vivo* con diferentes agentes terapéuticos, mejoraron su capacidad de respuesta a la estimulación con citocinas, encontrando incluso que el tratamiento con STI571 fue capaz de inducir una respuesta muy semejante a la obtenida en células progenitoras que provenían de MON. De forma interesante, aunque los progenitores provenientes de pacientes tratados con  $IFN\alpha$  no mostraron mejoría en su respuesta, los sujetos habían alcanzado la remisión hematológica e incluso al igual que el resto de los pacientes tratados, mostraban respuesta citogenética mayor.

Los datos anteriores son de gran relevancia, ya que demuestran que si bien la LMC se origina en una célula troncal muy primitiva, estas células no son capaces de recuperarse hematopoyéticamente a pesar de la mejoría de los pacientes después de recibir cada uno de los diferentes tratamientos. Así mismo, sugiere que el estroma es un componente importante en la regulación de la hematopoyesis leucémica, siendo particularmente interesante el comportamiento

registrado en los pacientes tratados con IFN $\alpha$  ya que mientras *in vitro* tienen serías deficiencias, *in vivo* se comportan como una población normal.

Finalmente es importante mencionar que aunque la LMC es el único padecimiento hematológico que se ha tratado con un inhibidor específico de la actividad tirosina cinasa de Bcr-Abl, dicho oncogen se encuentra presente aún después del tratamiento, lo que deja una vez mas en claro, que la alteración se origina en una subpoblación hematopoyética altamente primitiva, quiescente y resistente al efecto de los fármacos. En este sentido, el futuro análisis y caracterización de subpoblaciones primitivas en LMC y su asociación con la expresión y actividad de Bcr-Abl puede representar una alternativa para obtener la población residual normal presente en esta alteración y con ello plantear la posibilidad de emplear la purga biológica y expansión de células troncales como una alternativa de tratamiento.

## II. ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) arises from the malignant transformation of a hematopoietic stem cell (HSC) that gives rise to functionally defective progeny, including primitive and relatively mature progenitor cells (HPC). Both HSC and HPC are comprised within the population of CD34(+) cells, normally present in bone marrow (BM). In the present study, we have separated two different subpopulations of CD34(+) cells from CML marrow: CD34+Lin- cells (HPC) and CD34+CD38-Lin- cells (HSC), and assessed their progenitor cell content as well as their capacity to proliferate and expand in response to a combination of hematopoietic cytokines in serum- and stroma-free long-term liquid cultures before and after therapy with IMATINIB, Interferon, and Hematopoietic Cell Transplant (HCT). Interestingly, the proliferation and expansion potentials of CML cells before treatment were clearly deficient as compared to their normal counterparts. Such functional deficiencies were even more evident in CD34+CD38-Lin- cells. CD34+Lin- cells from patients treated with IMATINIB showed growth potentials similar to those of normal progenitors while progenitors from patients after HCT or IFN treatment showed reduced proliferation and expansion capacities as compared to their normal and IMATINIB-treated counterparts. These results indicate that, although treatment of CML patients resulted in complete hematological remission, only patients treated with IMATINIB showed a full hematopoietic recovery.

## II. INTRODUCCION

Las células sanguíneas se originan a través de un delicado y complejo proceso denominado hematopoyesis, el cual se desarrolla en sitios específicos dependiendo del estado de desarrollo del individuo, siendo la Médula Osea el principal órgano hematopoyetico en la etapa post natal.

Dentro de la Médula Osea existe un microambiente altamente regulado que se ha denominado microambiente hematopoyetico, y en el que se involucra la participación de componentes de la matriz extracelular, células estromales y células accesorias, que en su conjunto, y gracias a la secreción de diversos factores de crecimiento, constituyen el nicho biológico específico para desarrollar la hematopoyesis.

Sin embargo, ocasionalmente el delicado balance del sistema hematopoyetico se rompe y da lugar a enfermedades hematológicas, dentro de las cuales se encuentra la Leucemia Mieloide Crónica (LMC). La LMC es un padecimiento clonal, caracterizado por la presencia del cromosoma Philadelphia, cuyo producto proteico es la proteína cinasa BCR-ABL, la cual se encuentra constitutivamente activada induciendo diferentes actividades biológicas que conducen al crecimiento transformante.

En el mundo la LMC tiene una incidencia de 1 a 2 casos por cada 100,000 personas, y se considera que ocupa entre el 15 y 20% de todas las leucemias presentes en adultos. Su tratamiento ha involucrado el uso de diferentes agentes, y aunque en los últimos años se ha utilizado el STI571 como una importante opción terapéutica, la única opción curativa sigue siendo el trasplante de células hematopoyéticas.

En este sentido existen importantes estudios que permiten conocer diferentes aspectos sobre el comportamiento hematopoyetico de esta patología, sin embargo aún existen grandes interrogantes acerca de la biología básica de la enfermedad. De acuerdo con lo anterior en este trabajo se caracterizaron dos subpoblaciones celulares hematopoyéticas en relación con sus potenciales de

proliferación y expansión en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas, así como su relación con la presencia de Bcr-Abl.

### **III. MARCO TEORICO**

La sangre contiene una gran variedad de tipos celulares, cada uno de los cuales cumple con una función específica que lo hace indispensable para la vida de un organismo. Los eritrocitos o globulos rojos transportan oxígeno a través del cuerpo; las plaquetas detienen los sangrados promoviendo la coagulación sanguínea; y las células blancas (que incluyen a linfocitos, monocitos y neutrófilos) forman parte del sistema inmune y protegen a los individuos contra el ataque de agentes extraños.

Todos estos tipos celulares tienen un tiempo de vida limitado, el cual varia de unas cuantas horas como sucede con los neutrofilos, hasta poco mas de 100 días, como es el caso de los eritrocitos, lo que implica un alto recambio celular diario, que se ha llegado a calcular en alrededor de  $10^{12}$  células. Dicho número celular es mantenido por un muy pequeño grupo de células denominadas células seminales, células madre o células troncales, mediante un delicado proceso denominado hematopoyesis.

#### **1. Hematopoyesis**

##### **1.1. Características funcionales de las células hematopoyéticas primitivas**

En 1909, Alexander Maximov fue el primero en sugerir la existencia de células seminales hematopoyéticas (CSH), morfológicamente parecidas a linfocitos y capaces de migrar a través de la sangre a nichos específicos (que él nombró microecologios), en donde las células podían proliferar y dividirse hacia linajes particulares (Mayani et al, 2003). Sin embargo, no fue sino hasta 1961 que

Till y McCulloch, demostraron la existencia de un tipo celular capaz de dar origen a todas las células sanguíneas.

En sus experimentos, estos investigadores demostraron que después de irradiar a un ratón, su tejido hematopoyético se perdía totalmente. Sin embargo, al inyectar células procedentes de la médula ósea de otro ratón no irradiado, el ratón irradiado sobrevivía. Ellos observaron que en el bazo del ratón irradiado aparecían grupos de células en forma de colonias, compuestas fundamentalmente de células sanguíneas, tanto maduras como primitivas. A las células que originan a estos grupos de células se les denominó Unidades Formadoras de Colonias en el Bazo (CFU-S, por sus siglas en inglés). Posteriormente, en 1963 Becker y colaboradores demostraron que las CFU-S provenían del ratón donador de la médula ósea, y que estas células eran capaces de proliferar y expandirse masivamente. Los experimentos consistieron en inducir una lesión cromosómica no letal en las células de médula ósea del ratón donante e inyectarlas en un ratón irradiado. En estos experimentos se encontró que las CFU-S del ratón irradiado presentaban la lesión cromosómica inicial, al igual que las células que se generaban de estas colonias. Además, las CFU-S contenían células eritroides y no eritroides, por lo que se determinó, que la población original estaba constituida de células multipotentes que podían producir células maduras representativas de los diferentes linajes hematopoyéticos, una vez que habían tenido diferentes eventos de auto-renovación (Becker et al, 1963)

En 1970, Lajtha y McCulloch sugirieron que las CFU-S, pertenecían a una subpoblación de células muy inmaduras presentes también en médula ósea. Dicha población correspondía a células troncales hematopoyéticas pluripotenciales (PHSC, por sus siglas en inglés), cuyas propiedades han sido evaluadas mediante el uso de poblaciones de células hematopoyéticas enriquecidas, que son posteriormente transplantadas en ratones irradiados. De estos experimentos, se ha logrado determinar que las PHSC involucran diferentes subpoblaciones de células hematopoyéticas en donde se pueden encontrar células repobladoras de ratones receptores a corto y largo plazo, siendo éstas últimas la subpoblación más primitiva (Orlic y Bodine, 1994).

Con base en esta descripción, se diseñó un sistema de cultivo para mantener células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC, por sus siglas en inglés) y se ha descrito que estas células dan lugar a células clonogénicas formadoras de colonias en cultivos semisólidos unipotenciales y multipotenciales, después de un periodo de 5 a 8 semanas en cultivo. La frecuencia de estas LTC-IC en médula ósea es de 1 a 2 células por cada 10,000 y cada una de ellas mantiene las características de las PHSC (Sutherland et al, 1990).

Otro tipo de ensayos *in-vitro*, ha mostrado la existencia de células formadoras de colonias con alto potencial hematopoyético (HPP-CFC, por sus siglas en inglés). Dichas células son resistentes al efecto de drogas tóxicas, y se ha considerado como una población altamente primitiva, aunque en menor grado que las LTC-IC. Cada colonia que se deriva de una HPP-CFC, incluye de 50 a 500 células hematopoyéticas inmaduras, las cuales a su vez son capaces de generar células multilíneas o de un solo linaje (Orlic y Bodine, 1994).

No obstante los esfuerzos por describir las células seminales hematopoyéticas, las subpoblaciones descritas anteriormente poseen propiedades de PHSC, motivo por el cual se ha hecho necesario el empleo de marcadores específicos para cada subpoblación, por lo que actualmente se emplean antígenos de superficie para caracterizar a las diferentes subpoblaciones.

## **1.2. Características inmunofenotípicas de las células hematopoyéticas primitivas**

Conociendo que las células hematopoyéticas más primitivas no expresan un amplio número de marcadores de superficie asociados con la maduración terminal de tipos sanguíneos específicos, la falta de expresión de éstos ha sido empleada para la obtención de las células hematopoyéticas más inmaduras. Algunos antígenos de superficie comúnmente usados para aislar células humanas linaje negativo son: glicoforina A (presente en células del linaje eritroide), CD2 (marcador de timocitos, células T y NK), CD3 (detectado en timocitos y células T),

CD4 y CD8 (característicos de linfocitos T), CD14 (presente en monocitos), CD15 (encontrado en monocitos, neutrofilos y eosinófilos), CD16 (marcador de células NK y macrófagos), CD19 (indicador de células B), CD20 (característico de células B) CD56 (marcador de células NK y neuronas) y CD66b (presente en células polimorfo-nucleares). La selección de células linaje negativo (lin-), puede generar un enriquecimiento poblacional de 20 a 500 veces dependiendo de la combinación de marcadores usados (Wognum et al, 2003).

Aunado a lo anterior, recientemente se utiliza el antígeno CD34, cuyo empleo ha acelerado el estudio de la hematopoyesis humana (Bonnet, 2002). Esta molécula fue descrita en 1985 por Civin y colaboradores, quienes observaron que entre el 1 y 3% de las células nucleadas de médula ósea presentaban un antígeno que reaccionaba con el anticuerpo MY10. Este antígeno no se detectaba en células morfológicamente maduras, lo que sugería que era exclusivo de células primitivas. Cuando las células CD34+ se analizaron morfológicamente, se detectó que se trataba de una población enriquecida en blastos capaces de formar colonias hematopoyéticas en agar (Baines et al, 1988). Además, este grupo de células incluye a las células LTC-IC, así como a muchas de las CFC, aunque no incluye la gran mayoría de las células con diferenciación terminal.

Actualmente se sabe que el antígeno CD34 es una glicofosfoproteína expresada por células primitivas hematopoyéticas, células endoteliales y fibroblastos embrionarios, involucrada en eventos de adhesión, proliferación y diferenciación (Krause et al, 1996). La molécula puede presentarse como una glicoproteína transmembranal con peso molecular de 115 kDa, el cual integra un esqueleto proteico de 40 kDa, forma característica de precursores hematopoyéticos tempranos, y cuya expresión disminuye en células maduras (Strauss et al, 1986). Además de la forma transmembranal, existe un almacén intracelular de CD34 -que puede ser translocado a la membrana plasmática en respuesta a señales extracelulares-, así como una forma soluble -la cual se produce después de su decremento en la membrana celular (Fernández et al, 2000).

Con base en la expresión de diferentes antígenos de superficie, ahora se sabe que las células primitivas humanas se caracterizan por la alta expresión de CD34, intermedia expresión de c-kit y Thy-1, y baja o nula expresión de CD38, HLA-DR, CD45RA, CD33 y CD71 (Szilvassy, 2003).

C-KIT o CD117 corresponde al receptor del Factor de Células Troncales y se expresa aproximadamente en el 65% de las células CD34, incluyendo células progenitoras comprometidas hacia algún linaje (Wognum et al, 2003). Thy-1 o CD90 por su parte está involucrado en el desarrollo de células hematopoyéticas, al mediar señales negativas que resultan de la inhibición de la proliferación (Mayani y Lansdorp, 1998). El antígeno CD38, corresponde a una molécula transmembranal de 45 kDa ausente en células hematopoyéticas inmaduras humanas con alto potencial de autorrenovación y diferenciación multilinaje. Esta molécula parece estar involucrada en procesos de diferenciación ya que su expresión es nula en estados tempranos e intermedios de la diferenciación, mientras que en estados tardíos su expresión aumenta considerablemente (Felgar, 1999; Todisco et al, 2000).

En cuanto a los marcadores HLA-DR, CD45RA, CD71 y CD33 se sabe que se encuentran ausentes o se expresan solo por tiempos muy cortos en células hematopoyéticas muy inmaduras, así como en células progenitoras, pero se encuentran altamente expresados en ciertos tipos de progenitores comprometidos a algún linaje, por lo que estos marcadores pueden ser usados para subdividir la población de células CD34 en fracciones multipotentes y comprometidas en la diferenciación (Wognum et al, 2003).

En adición al inmunofenotipo mencionado anteriormente, nuevos marcadores de células primitivas hematopoyéticas han sido descritos a lo largo de la década pasada, y uno de los hallazgos más sorprendentes fue el hecho de encontrar que la expresión del antígeno CD34 es reversible y que incluso células con inmunofenotipo CD34-c-kit+lin-, son capaces de regenerar la hematopoyesis en ratones inmunodeficientes e incluso son capaces de diferenciarse a progenitores CD34+ y hacia múltiples linajes hematopoyéticos en hospederos

tanto primarios como secundarios (Zanjan et al, 1998; Bhatia et al, 1998; Guo et al, 2003).

Aunado a lo anterior, se ha descrito que las células primitivas hematopoyéticas son CD133 (AC133) positivas y CD7 negativas. Dicho inmunofenotipo se presenta con una frecuencia del 0.2% y es característico de progenitores inmaduros e incluso de la fracción celular CD34-CD38-lin- humana, la cual tiene actividad repobladora en ratones inmunodeficientes (Gallacher et al, 2000).

Además de los antígenos antes mencionados, se sabe que la fracción de células humanas CD34+ que tiene actividad repobladora en ratones inmunodeficientes, también son positivas a la glicoproteína P (P-gp) (una bomba membranal responsable de la resistencia a drogas); a CDCP1 (del inglés Cub-domain containing protein); así como a los receptores 1 y 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1 y VEGFR2 o KDR), los cuales se han visto involucrados con la estimulación del ciclo celular y la viabilidad de células primitivas hematopoyéticas (Wognum et al, 2003).

### **1.3. Organización estructural del sistema hematopoyético**

A pesar de la extensa descripción que se ha realizado en cuanto a los marcadores de superficie presentes en las células primitivas hematopoyéticas, no existe un fenotipo definitivo que permita identificar a la población o poblaciones más primitivas, y ya que éste es un sistema altamente dinámico y complejo, su estudio se ha compartimentalizado en 4 grandes subpoblaciones (**Figura 1**).

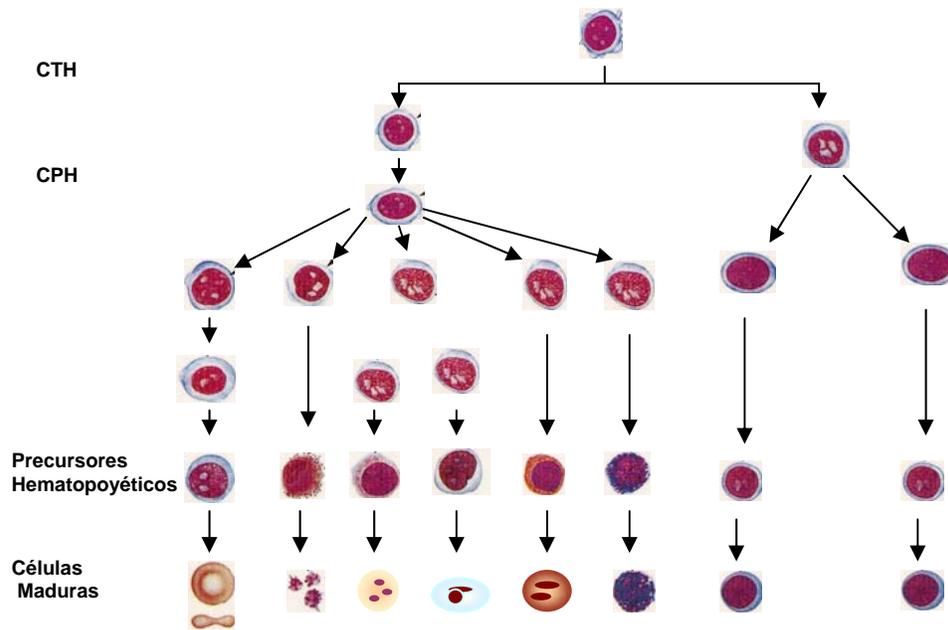
El primer compartimiento corresponde al de las Células Troncales Hematopoyéticas (CTH), también nombradas células madre, células seminales o células tallo. La mayoría de estas células residen en la médula ósea, donde constituyen una población heterogénea, con morfología linfo-blastoide. Su número celular representa aproximadamente 1 de cada  $10^4$  células del total contenido en la médula ósea (Szilvassy y Hoffman, 1995).

Funcionalmente las CTH son capaces de autorrenovarse en células semejantes a ellas mismas y de dar origen a los diferentes tipos de células sanguíneas, es decir son multipotenciales. Además que son capaces de restablecer la hematopoyesis por varios meses en ratones inmunodeficientes o previamente irradiados, por lo que son conocidas como células repobladoras de ratones NOD-SCID (SRC) (Mayani et al, 2003).

Inmunofenotípicamente esta subpoblación presenta el antígeno CD34, y carece de la expresión de CD38. Además se sabe que son células CD133+, CD90+ y CD117+, y carecen de la expresión de CD45-RA y HLA-DR (Engelhardt et al, 2002). Cabe mencionar que dentro de las CTH se incluye a la subpoblación CD34-lin-, la cual correspondería a la subpoblación hematopoyética más primitiva (Osawa et al, 1996).

Conforme las CTH avanzan en el proceso de maduración, dan origen al segundo compartimiento hematopoyético, formado por las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH). Esta es una población celular muy heterogénea que constituye el 0.3% del total de las células presentes en la médula ósea (Engelhardt et al, 2002). Fenotípicamente las CPH adquieren la expresión de los antígenos CD38, CD45RA, y CD71, y mantienen la expresión del antígeno CD34. Funcionalmente éstas células son capaces de formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos, y su potencial proliferativo es variable, pudiendo ser alto, intermedio o bajo (Mayani et al, 1993).

Al continuar con su proceso de diferenciación, las CPH dan lugar al tercer compartimiento, que incluye a los precursores hematopoyéticos reconocibles por su morfología, que en las diferentes líneas de diferenciación hematopoyética presentan diferentes estadios de maduración, y finalmente el cuarto compartimiento que agrupa a las células precursoras, dan origen a las células sanguíneas circulantes encargadas de realizar funciones biológicas específicas en el organismo.



**Figura 1. Organización jerárquica del sistema hematopoyético.** El esquema muestra en forma piramidal a las Células Seminales Hematopoyéticas (SCH), que dan lugar a las Células Progenitoras Hematopoyéticas (SPH), para finalmente encontrar en la base de la pirámide a las Células Precursoras Hematopoyéticas y Células Maduras Circulantes.

#### 1.4. Organos y microambiente hematopoyetico.

Debido a las altas exigencias de la hematopoyesis, este proceso toma lugar en órganos específicos, dependiendo de la etapa de desarrollo del individuo. Las primeras CTH aparecen en el saco vitelino y casi simultáneamente se pueden detectar en la región aorta gonada mesonefros del embrión. Posteriormente, las CTH son detectadas en hígado fetal y en el bazo fetal, donde existe una elevada actividad hematopoyética antes del nacimiento. Ya en la etapa posnatal, mas del 90% de la actividad hematopoyética toma lugar en el estroma de la médula ósea, dentro del tejido esponjoso de los huesos en lo que se ha denominado Microambiente Hematopoyetico (**Figura 2**) (Morrison, 1995).

El microambiente hematopoyetico (MH) está constituido por células estromales, células accesorias y diversos componentes de la matriz extracelular.

Todos estos constituyen un nicho indispensable para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas (Nicola, 1989; Mayani et al, 2002; Short et al, 2003). El componente estromal incluye los elementos del tejido conectivo no hematopoyetico, que provee un soporte estructural y funcional para desarrollar la hematopoyesis. Dentro de este componente se encuentran los siguientes tipos celulares:

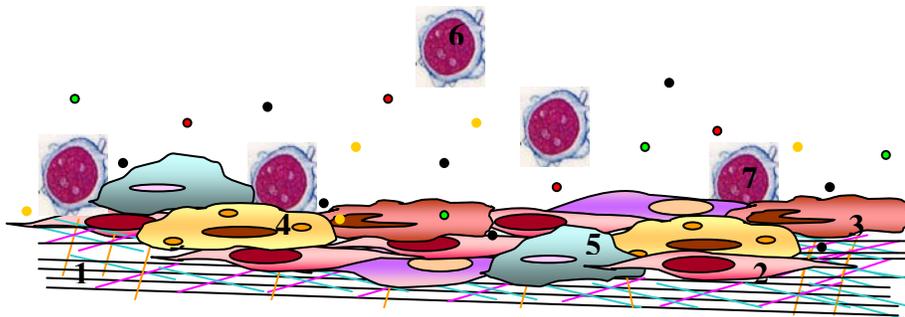
- Fibroblastos: representan el mayor componente del microambiente hematopoyetico tanto *in-vivo* como *in vitro* en los cultivos de médula ósea a largo plazo (LTMC – por sus siglas en inglés). Estas células tienen la capacidad de producir y liberar al medio citocinas como el Factor de Células Seminales (SCF), Interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6), así como los factores estimuladores de colonias de granulocitos y de granulocitos-monocitos (G-CSF, y GM-CSF respectivamente) (Dorshkind, 1990). Así mismo, son capaces de secretar colágena tipo I y tipo III, que junto con la colágena tipo IV (secretada por las células endoteliales), generan el mayor componente de la membrana basal del microambiente hematopoyetico (Chabannon y Torok-Storb, 1992).
- Células reticulares: Células que por su localización alrededor de los sinusoides venosos, presentan extensiones citoplásmicas que les permite estar en estrecho contacto con células endoteliales y regular la migración de células sanguíneas hacia la circulación (Chabannon y Torok-Storb, 1992).
- Adipocitos: Células grandes, con núcleos pequeños y citoplasma vacuolado con contenido lipídico, que ocupan el mayor espacio de la médula ósea de mamíferos adultos (médula ósea amarilla). En LTMC su aparición depende de la adición de hidrocortisona, y se piensa que tienen efecto en inhibir la hematopoyesis (Dorshkind, 1990; Chabannon y Torok-Storb, 1992).
- Células endoteliales: Ubicadas como revestimiento de los vasos sanguíneos, representan un componente crítico durante el “homing” de las células hematopoyéticas. Estas células expresan en su superficie el antígeno CD34 y se cree que regulan la hematopoyesis a través de la producción de colágena tipo IV y laminina, así como IL-6, y los diferentes factores estimulantes de colonias (G-CSF, GM-CSF y M-CSF) (Rafii, 1994).

- Osteoblastos: Células encargadas de secretar la matriz del hueso, que son capaces de secretar citocinas inhibitoras de la hematopoyesis como el Factor de Crecimiento Transformante beta ( $TGF\beta$ ), e Interleucina 1 (IL-1) (Chabannon y Torok-Storb, 1992).

Además del componente estromal, el MH también tiene células que derivan del componente hematopoyetico, como los macrófagos y los linfocitos, éstos últimos considerados células accesorias.

Los macrófagos son células altamente abundantes en los LTMC, así como en la médula ósea, y se encargan de regular la hematopoyesis a través de la secreción de citocinas como Factor de Necrosis Tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), GM-CSF, y las interleucinas 1, 3, 6 y 8 (Rappolee y Webb, 1988).

Como se mencionó anteriormente, el MH también esta conformado por elementos de la matriz extracelular, dentro de los que se encuentran principalmente colágenas tipo I, III y IV; fibronectina, que contiene diversos dominios estructurales que median el anclaje celular, así como la adhesión a colágena y laminina. Otros componentes de la matriz extracelular son las hemonectinas, y los proteoglicanos, quienes junto con los componentes antes descritos, se encargan de regular la adhesión, autorrenovación y diferenciación çde las células hematopoyéticas (Chabannon y Torok-Storb, 1992).



**Figura 2. Microambiente Hematopoyético.** El esquema muestra los componentes de la matriz extracelular (1), así como células fibroblásticas (2), endoteliales (3), adipocitos (4) y osteoblastos (5), además de células accesorias (6) y células seminales hematopoyéticas (7).

## **1.5. Citocinas que regulan la hematopoyesis.**

El funcionamiento del sistema hematopoyetico, depende de reguladores intrínsecos (factores de transcripción nuclear, moléculas involucradas en la transducción de las señales, y reguladores del ciclo celular), los cuales son modulados por señales externas, provistas por citocinas y matriz extracelular. Hasta la fecha mas de 30 citocinas hematopoyéticas han sido identificadas y estas moléculas se encargan de regular tanto positiva como negativamente la sobrevivencia, proliferación, diferenciación y muerte de las células hematopoyéticas (Mayani et al, 2003). Algunas de las citocinas hematopoyéticas ejercen sus efectos sobre CTH muy tempranas (Factores hematopoyeticos linaje no específicos) y algunas otras actúan solamente sobre progenitores hematopoyeticos comprometidos hacia una determinada línea de diferenciación (Factores hematopoyeticos linaje específicos) (Tavassoli, 1993; Nicola, 1989), aunque también existe interacción entre los diferentes factores de crecimiento, de manera que la regulación de la hematopoyesis involucra una amplia gama de eventos celulares. Dentro de las principales citocinas reguladoras de la hematopoyesis (tanto estimuladoras como inhibidoras) se encuentran:

Factor de Células Seminales (SCF por sus siglas en inglés).

Ubicado en el brazo largo del cromosoma 12, es también conocido como factor steel, ligando de Kit y/o factor de crecimiento de células cebadas. El SCF es producido en forma soluble y transmembranal como producto de splicing alternativo del mismo gen. La forma transmembranal (de 248 aminoácidos), puede ser cortada proteolíticamente para generar la forma soluble (de 164 aminoácidos) (Anderson et al, 1990).

Dentro de sus principales funciones, se ha descrito que es esencial como regulador de la sobrevivencia, crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas en cualquier estadio de diferenciación, así como en el desarrollo de melanocitos y células de la línea germinal, durante el desarrollo embrionario y la vida adulta. También se encuentra involucrado en el “homing” de las células seminales a sus

sitios apropiados de desarrollo y en la inhibición de la apoptosis (Roy-Keller y Linnekin, 2001).

Durante el desarrollo embrionario el SCF es expresado en la espina dorsal, cerebelo y bulbos olfatorios, lo que sugiere un papel regulador en el sistema nervioso central. En el adulto se expresa en células endoteliales, monocitos, fibroblastos, epitelio intestinal, placenta, cerebelo, testículos, bazo y células de Sertoli.

En cuanto al linaje hematopoyético, su expresión ha sido detectada en células CD34+ humanas, y se sabe que es capaz de sinergizar con otras citocinas para promover la formación de colonias específicas de diferentes linajes. Aunado a lo anterior se sabe que cuando esta citocina se usa en combinación con otros factores de crecimiento hematopoyético, puede soportar la expansión o inducir la proliferación de células progenitoras. El SCF por sí mismo, es un potente factor de sobrevivencia de CTH, así como de su progenie más comprometida in vitro (Roy-Keller y Linnekin, 2001). (**Tabla 1**).

Ligando de la Tirosina Fetal 3.

El Ligando de la Tirosina Fetal 3 (Flt-3L), es un miembro de la familia de citocinas que al unirse a su receptor (Flt-3), estimula la proliferación de células hematopoyéticas. El gen que codifica a esta proteína se encuentra ubicado en el cromosoma 19q13.3, a partir del cual se pueden generar dos diferentes proteínas. La isoforma predominante, es una proteína transmembranal que puede ser cortada proteolíticamente para generar la forma soluble del Flt-3L (Pulendran y Dillon, 2001).

Esta molécula se expresa en forma ubicua en diferentes tejidos, aunque su mayor expresión se detecta en células mononucleares de sangre periférica. En contraste, su receptor se encuentra restringido a células seminales y progenitoras del sistema hematopoyético (Brasel et al, 1995).

El Flt-3L, por sí mismo, es capaz de estimular el crecimiento de células seminales y progenitoras hematopoyéticas, así como de los linajes linfoides y mieloides, aunque tiene un efecto mucho mayor cuando se usa en combinación

con otros factores de crecimiento. Esta molécula induce alta proliferación en células de medula ósea, cordón umbilical y sangre periférica, aunque sinergiza con otros factores (GM-CSF, IL-3, SCF, IL-6, G-CSF, IL-1b, TPO, y EPO), para inducir expansión y crecimiento de colonias de células hematopoyéticas humanas (Brasel et al, 1996). Además de lo anterior, el Flt-3L actúa en forma sinérgica con citocinas específicas para inducir timopoyesis, desarrollo de células Naturales Asesinas (NK-por sus siglas en inglés) y desarrollo de células B, además de que puede incrementar los progenitores megacariocíticos en células seminales de sangre de cordón umbilical y sangre periférica (Pulendran y Dillon, 2001). (**Tabla 1**).

Trombopoyetina (TPO).

La trombopoyetina, ubicada en el cromosoma 3q27-28 del humano, es sintetizada en el hígado como una glicoproteína de 332 aa, con un peso molecular de 80-90 kDa. Para ejercer sus efectos la molécula es secretada a la circulación donde se une a su receptor (c-mpl), ubicado preferencialmente en plaquetas y megacariocitos quienes gracias a su efecto evitan la apoptosis e incrementan su número celular y su tamaño. (**Tabla 1**).

Cuando la TPO es administrada *in-vivo*, provoca un incremento en el número de precursores de megacariocitos (Meg-CFC), e induce un incremento de precursores de todos los linajes hematopoyéticos (Kuter, 2001). Diversos estudios *in vitro* han mostrado que la TPO actúa sinérgicamente con FLT-3L y c-kit para estimular la proliferación y expansión de células troncales hematopoyéticas (dentro de las que se encuentra las subpoblaciones CD34+ y CD34+CD38-). Aunado a lo anterior, se ha descrito que poblaciones celulares CD34+CD38- carentes del receptor para TPO (c-mpl negativa), pierden la capacidad de repoblar ratones inmunodeficientes y de tener actividad repobladora a largo plazo lo que no sucede en su contraparte c-mpl positiva. Este hecho demuestra que la TPO no solo estimula la megacariopoyesis, sino que también es capaz de regular un amplio espectro de eventos hematopoyéticos (Wendling, 1999).

## Interleucina 6 (IL-6)

El gen de la interleucina 6 humana se encuentra ubicado en el cromosoma 7p21 y codifica a una proteína de 186 aa, con al menos cinco diferentes formas moleculares. Sus pesos moleculares oscilan entre 21 y 28 kDa, y la diferencia reside en las modificaciones postraduccionales como glicosilación y fosforilación (Matsuda e Hirano, 2001).

La IL-6, es una citocina pleiotropica, producida por diferentes tipos celulares, siendo sus principales fuentes macrófagos, fibroblastos y células endoteliales; aunque también es producida por células T, células B, monocitos, osteoblastos, astrocitos, células de la glia, queratinocitos y células de músculo liso (Astaldi et al, 1980).

Para ejercer sus efectos, esta citocina se une a su receptor, que consiste de dos subunidades transmembranales: la alfa ( $\alpha$ ), es una glicoproteína de 80 kDa que se une con baja afinidad a la IL-6, y la subunidad beta ( $\beta$ ), que corresponde a una glicoproteína de 130 kDa que se une al heterodimero IL-6-IL6 $\alpha$ R para formar un complejo de alta afinidad que es capaz de inducir diferentes señales (Matsuda e Hirano, 2001).

Dentro de sus principales funciones, se ha reportado que es capaz de estimular la proliferación de células B normales o leucémicas, e inducir la producción de inmunoglobulinas. Así mismo es requerida para la producción de anticuerpos por las propias células B, y para inducir la activación, crecimiento y diferenciación de células T. Aunado a lo anterior, se ha descrito que es capaz de actuar como un factor de estimulación y regeneración hepático (Beagley et al, 1989).

En el área hematopoyética, se sabe que la IL-6 en combinación con Interleucina 3 (IL-3), induce la proliferación de progenitores hematopoyéticos multipotentes. Además actúa sinérgicamente con el Factor Estimulante de Colonias de Monocitos (CFU-M-por sus siglas en inglés) para inducir el incremento en número y tamaño de progenitores de tipo macrofágico. Un dato de consideración, es que la falta de producción de IL-6 puede conducir a padecimientos como Anemia de Fanconi, lo que evidencia el papel de la IL-6 en la

regulación de las células seminales hematopoyéticas (Matsuda e Hirano, 2001). **(Tabla 1)**.

### Interleucina 3 (IL-3)

El gen humano para la Interleucina 3 se encuentra ubicado en el cromosoma 5q23-31, y codifica a una proteína globular altamente glicosilada, que se une con baja afinidad a la cadena  $\alpha$  de su receptor el cual a su vez interactúa con la subunidad  $\beta$  para generar un complejo trimérico de alta afinidad, encargado de transducir diferentes señales.

La IL-3 es producida principalmente por linfocitos T, células NK, células cebadas y eosinófilos, y una vez unida a su receptor es capaz de estimular el crecimiento, diferenciación y sobrevivencia de células seminales y progenitoras hematopoyéticas, incluyendo progenitores comprometidos a linajes particulares, así como células maduras. Además, es capaz de estimular las funciones efectoras de células cebadas, eosinófilos, basófilos y macrófagos. En combinación con CD40, la IL-3 es capaz de estimular la producción de células dendríticas *in-vitro*, y el crecimiento de progenitores B (Schareder, 2001). **(Tabla 1)**.

### Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

El gen del GM-CSF se encuentra en el cromosoma 5q31.1, y codifica a una proteína con peso molecular entre 14 y 33 kDa, que posee dos uniones disulfuro intramolecular y diferentes sitios de glicosilación. La proteína madura utiliza un complejo receptor que consiste en una cadena  $\alpha$ , a la cual se une con baja afinidad, y una cadena  $\beta$  (común con IL-3 e IL5), que al unirse con la cadena  $\alpha$  y el GM-CSF forman un complejo de alta afinidad (Altmann et al, 1995).

Esta molécula es producida por linfocitos T activados, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células estromales, aunque reportes aislados sugieren que también es producido por linfocitos B, células cebadas, eosinófilos y osteoblastos.

El GM-CSF estimula la supervivencia de células formadoras de colonias hematopoyéticas de los linajes macrófago, megacariocítico, neutrofílico y eritroide. Así mismo incrementa la actividad quimiotáctica de eosinófilos y neutrófilos, incrementa la expresión de moléculas de adhesión, la actividad fagocítica y la capacidad que tienen estas células para mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. En sinergismo con  $TNF\alpha$ , estimula la proliferación y diferenciación de células dendríticas involucradas en la presentación de antígenos, y es capaz de estimular a los macrófagos a liberar citocinas, como: IL-1, G-CSF, M-CSF,  $TNF\alpha$ , IL-6 y prostaglandinas (Nicola, 2001). (**Tabla 1**).

#### Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF).

El gen humano del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos, se encuentra codificado en el cromosoma 17q21-22, y da lugar a una glicoproteína de 20 a 25 kDa, que para ejercer sus efectos biológicos requiere de la interacción con su molécula receptora asociada a membrana (G-CSFR).

Esta molécula es expresada por monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, aunque también se ha detectado en células de carcinoma escamoso, glioblastoma y hepatoma (Nagata, 2001).

El G-CSF estimula la formación de colonias de granulocitos en cultivos semisólidos de médula ósea, y a diferencia de otros Factores Estimulantes de Colonias, su efecto es más específico para el linaje granulocito neutrofílico, en donde además de prolongar la supervivencia, incrementa la capacidad funcional de las células maduras (Cohen et al, 1987). (**Tabla 1**).

#### Eritropoyetina (EPO)

En el humano, el gen de la eritropoyetina se presenta como una sola copia en el cromosoma 7q11-22, y codifica a una proteína globular de 34 kDa, que se une a su receptor de 55kDa, para ejercer sus efectos biológicos.

La EPO se expresa principalmente en riñones e hígado, en donde es secretada por fibroblastos peritubulares y hepatocitos. Esta molécula también ha sido detectada en pulmones y testículos en estados normales. Sin embargo, en

estado de hipoxia su expresión se incrementa y llega a ser incluso detectada en bazo (Spivak, 2001).

La principal actividad de la EPO es controlar la producción de células eritroides a través de la promoción de la supervivencia, proliferación y diferenciación de progenitores eritroides en la Médula Osea, aunque tiene efectos específicos dependiendo de su célula blanco, ya que se conoce que en células progenitoras eritroides tempranas (BFU-E), la EPO actúa como agente mitogénico y promueve su proliferación, mientras que en progenitores eritroides tardíos (CFU-E), actúa como agente de supervivencia (Miyajima et al, 1999).  
**(Tabla 1)**

#### Factor de Necrosis Tumoral alfa ( $TNF\alpha$ )

El gen humano para el  $TNF\alpha$  se encuentra localizado en el cromosoma 6p21.1-21.3, y codifica a una proteína de 157 aa, con peso molecular de 17 kDa, que se une a dos diferentes receptores: p60 (también llamado p55, CD120a o tipo I) y p80 (denominado p75, CD120b o tipo II). El receptor p60 es expresado en todos los tipos celulares, mientras que p80 solo se expresa en células hematopoyéticas, células del sistema inmune y células endoteliales, lo que sugiere actividades biológicas diferentes (Aggarwal et al, 1985).

Esta molécula es producida por un amplio número de tipos celulares, principalmente macrófagos y monocitos, células T, células B, astrocitos, fibroblastos, células naturales asesinas (NK), células de músculo liso, células epidermales y diversas líneas tumorales (melanoma, tumores de próstata, tumores pancreáticos y tumores mamarios).

El  $TNF\alpha$  es una citocina multipotencial que regula diferentes actividades biológicas dependiendo de su célula blanco, es requerido para la protección contra infecciones bacteriales, la replicación viral, la modulación del sistema inmune y la regulación de choque séptico y enfermedades autoinmunes.

En el sistema hematopoyético, inhibe la eritropoyesis normal y leucémica (alterando la cinética del linaje eritroide), disminuye la expresión de receptores a G-CSF, reduce la expresión del receptor c-kit, suprime la proliferación de colonias

de granulocitos, monocitos y macrófagos. Específicamente en macrófagos, es capaz de incrementar la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, inducir la expresión de GM-CSF, G-CSF e IL-1, aunque también reduce la unión y migración de linfocitos a través de células endoteliales. En estas últimas, es capaz de inducir la producción de IL-1, G-CSF, GM-CSF y el receptor de IL-3. Aunado a ello, estimula la expresión de moléculas de adhesión como: ICAM-1, VCAM-1, E y P-selectinas (Aggarwal et al, 2001). (**Tabla 1**).

Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF $\beta$ ).

La familia de reguladores de crecimiento y diferenciación TGF $\beta$ , se encuentra formada por 3 miembros purificados en mamíferos (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, y TGF $\beta$ 3), y codificados por genes únicos localizados en diferentes cromosomas (19q13, 1q41 y 14q24 respectivamente). Las formas bioactivas de TGF $\beta$  tienen un peso molecular de 25 kDa, y están compuestas de dos cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro, las cuales pueden formar homodímeros o heterodímeros, que se unen a dos diferentes receptores (TGF $\beta$ RI y TGF $\beta$ RII), para formar un complejo de alta afinidad encargado de traducir las señales (Flanders y Roberts, 2001).

El TGF $\beta$  es producido por células embrionarias, células mesenquimales, células epiteliales, cerebro y médula ósea, aunque las fuentes más abundantes son plaquetas, hueso y bazo. Sus efectos son diversos dependiendo del tipo celular y la concentración en la que se presente, pero es capaz de regular la proliferación y diferenciación celular, así como la producción y degradación de matriz extracelular. Además, se sabe que es capaz de regular migración celular, respuesta inmune y respuesta inflamatoria. Se ha caracterizado como un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, endoteliales y neuroectodermales, ejerciendo sus efectos en la fase G1 del ciclo celular (Poliak, 1996).

En el sistema hematopoyético, es capaz de disminuir la frecuencia de células seminales y progenitoras hematopoyéticas, mediante la inhibición de su proliferación. Así mismo, el TGF $\beta$ 1 es capaz de inhibir la proliferación de

progenitores hematopoyeticos tempranos, pero no tardíos, aún en presencia de EPO, SCF, GM-CSF e IL-3. Las células CD34+CD38- muestran una alta sensibilidad a inhibir la progresión del ciclo celular por TGF $\beta$ , mientras que cuando las células avanzan en su diferenciación esta inhibición tiende a disminuir, aunque no desaparece (Fortunel et al, 2000) (**Tabla 1**).

Nombre de la molécula	Receptores	Ubicación cromosomal	Quién la produce	Principales efectos en hematopoyesis
Factor de Células Seminales (SCF).	c-kit	12q22	Células endoteliales, fibroblastos, bazo, timo, placenta y cerebelo.	Regulador de la supervivencia, proliferación y diferenciación de células seminales y progenitoras hematopoyéticas.
Ligando de Tirosina Fetal 3, (Flt-3L).	Flt-3R.	19q13.3	Expresión ubicua, pero alta en células mononucleares de sangre periférica.	Estimula la proliferación de células seminales y progenitoras hematopoyéticas.
Trombopoyetina	c-mpl	3q27-28	Células hepáticas.	Regula la maduración de plaquetas y megacariocitos.
Interleucina 6 (IL-6).	IL-6R	7p21	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y monocitos.	Regulador de la respuesta inmune, reacciones de fase aguda y regulador de células seminales hematopoyéticas.
Interleucina 3 (IL-3).	IL3R	5q23-31	Linfocitos T, células NK, células mast, eosinófilos.	Estimula el crecimiento, diferenciación y supervivencia de células hematopoyéticas,
Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos.	GM-CSFR	5q31.1	Linfocitos T activados, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células estromales.	Estimula la formación de colonias de diferentes linajes hematopoyeticos, incrementa actividad quimiotáctica y fagocítica. Estimula a macrófagos a producir diversas citocinas.
Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos	G-CSFR	17q21-22	Monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos.	Regula la producción de granulocitos neutrofilos y activa la maduración de neutrofilos.
Eritropoyetina	EPOR	7q11-22	Fibroblastos peritubulares renales y células hepáticas	Regula la proliferación y supervivencia de células progenitoras eritroides.
TNF $\alpha$	P60 y p80	6p21.1-21.3	Macrófagos, monocitos, células T, células B, fibroblastos, células NK.	Inhibidor de la eritropoyesis, supresor de colonias del linaje mieloide.
TGF $\beta$	TGF $\beta$ RI y TGF $\beta$ RII	19q13, 1q41 y 14q24.	Plaquetas, hueso y bazo.	Inhibidor del número y capacidad proliferativa de células seminales y progenitoras hematopoyéticas.

**Tabla 1. Citocinas reguladoras de la hematopoyesis.**

Como se ha descrito, son muy diversos los estímulos que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células hematopoyéticas, y a pesar de que durante el proceso de maduración existe un estricto mecanismo de regulación, llegan a presentarse situaciones en donde el equilibrio se pierde, conduciendo a diferentes patologías hematológicas, dentro de las que se encuentran las leucemias.

## **2. Leucemia Mieloide Crónica.**

### **2.1. Generalidades**

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) fue descrita por primera vez en 1845 por Hughes Bennet, quien mencionó que se trataba de una enfermedad de tipo infeccioso, que causaba hipertrofia en hígado y bazo, hasta provocar la muerte. Sin embargo, pocas semanas después Rudolf Virchow, publicó un caso similar en el que mencionaba que la enfermedad no era infecciosa y que implicaba un incremento en el número de células sanguíneas, por lo que acuñó el término de leucemia (del griego leucos, que significa célula blanca). En el año 1870, Neumann reconoció que las células leucémicas descritas se originaban en la médula ósea y casi cien años después, en 1960, Nowel y Hungerford describieron que en el padecimiento existía un pequeño cromosoma anormal que se presentaba en todos los casos de esta leucemia. No obstante, fue hasta el año 1973 que Janet Rowley, describió que el cromosoma anormal era provocado por una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, designándole el nombre de cromosoma Philadelphia (Ph) (Rowley, 1973; Piller, 2001).

Actualmente la LMC es definida como una enfermedad mieloproliferativa clonal, que se origina en las CTH y que ésta caracterizada por la presencia del cromosoma Philadelphia y su producto oncogénico Bcr-Abl (Jorgensen y Holyoake, 2001).

La incidencia de la LMC en el mundo es de aproximadamente 1 a 2 casos por cada 100, 000 personas, siendo diagnosticados entre 3500 y 5000 nuevos casos por año en Estados Unidos, lo que provoca que este padecimiento ocupe el 15 y 20% de todas las leucemias presentes en adultos. En lo referente a la República Mexicana, se ha calculado que existen alrededor de 80,000 casos de leucemia, de los cuales el 10% corresponde a LMC (Deininger y Druker, 2003; Góngora-Bianchi et al, 2005).

La edad promedio de diagnóstico es de 60 años, y se presenta con menor frecuencia en personas menores de 40 años, con tendencia a incrementarse exponencialmente con la edad. No existe predisposición genética o geográfica para adquirir este padecimiento, aunque algunos autores lo han asociado con exposición a altas dosis de radiación ionizante (Deininger et al, 1998, Deininger y Druker, 2003).

Los síntomas típicos de la enfermedad son fatiga, anorexia, pérdida de peso, y esplenomegalia (que se presenta alrededor del 50% de los pacientes). Sin embargo, cerca del 40% de los pacientes son asintomáticos y su diagnóstico se basa únicamente en una cuenta de células sanguíneas anormal (Sawyers, 1999).

Clínicamente, la LMC se divide en fase crónica, fase acelerada, y crisis blástica. La primera de ellas, es un estado pre-maligno en el que se diagnostica el 90% de los pacientes, quienes permanecen en ella durante 3 a 8 años. En esta fase, las células sanguíneas retienen su capacidad de diferenciarse y funcionar de manera normal, hasta que el padecimiento progresa a la fase acelerada en la que se comienzan a detectar células inmaduras en la circulación sanguínea. Los criterios diagnósticos de la fase acelerada no son universales (por lo que existen autores que no la refieren), y su duración varía de semanas a años. Finalmente, la enfermedad progresa a la crisis blástica, caracterizada por 30% o más células inmaduras (blastos) en circulación e incluso en infiltrados extramedulares. Durante esta fase la supervivencia de los pacientes se reduce a meses e incluso semanas (Epstein, 1999; Lee, 2000).

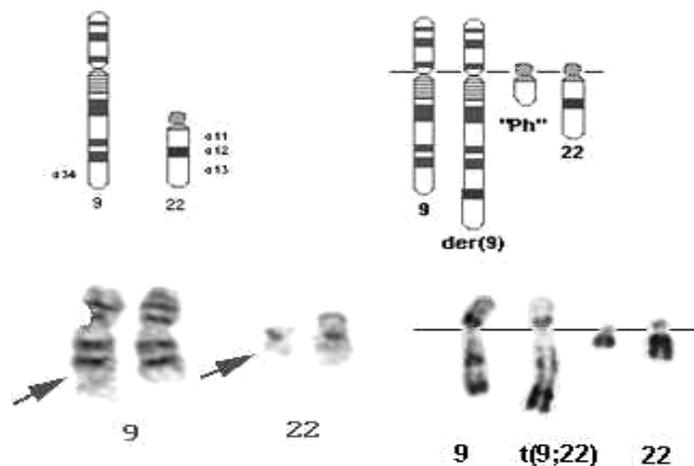
## **2.2. Cromosoma Philadelphia y p210**

La Leucemia Mieloide Crónica es el único padecimiento hematológico directamente asociado a la presencia de una anomalía cromosómica, ya que el 95% de los pacientes presentan el cromosoma Ph (**Figura 3**), mientras que el restante 5% presentan translocaciones extrañas (que no pueden ser detectadas

por análisis citogenéticos rutinarios), o tienen translocaciones complejas que involucran la participación de un tercer cromosoma (Cross y Reiter, 2002).

En contraste, existen casos de sujetos sanos que presentan el cromosoma Ph, sin desarrollar la enfermedad, por lo que se ha sugerido que en ellos, la anomalía cromosómica se origina en células progenitoras comprometidas o incluso en células precursoras, cuya progenie esta destinada a morir después de cierto número de divisiones celulares (Biernaux et al, 1996; Clarkson, 2003).

Desde el punto de vista molecular, el cromosoma Ph es un cromosoma 22 acortado, que resulta de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)], en donde se involucra la adición de segmentos 3' del gen ABL (ubicado en el cromosoma 9q34) a segmentos 5' del gen BCR (ubicado en el cromosoma 22q11), creando un gen híbrido BCR-ABL que es transcrito a un ARN mensajero quimérico BCR-ABL de 8.5kb (Epstein, 1999).



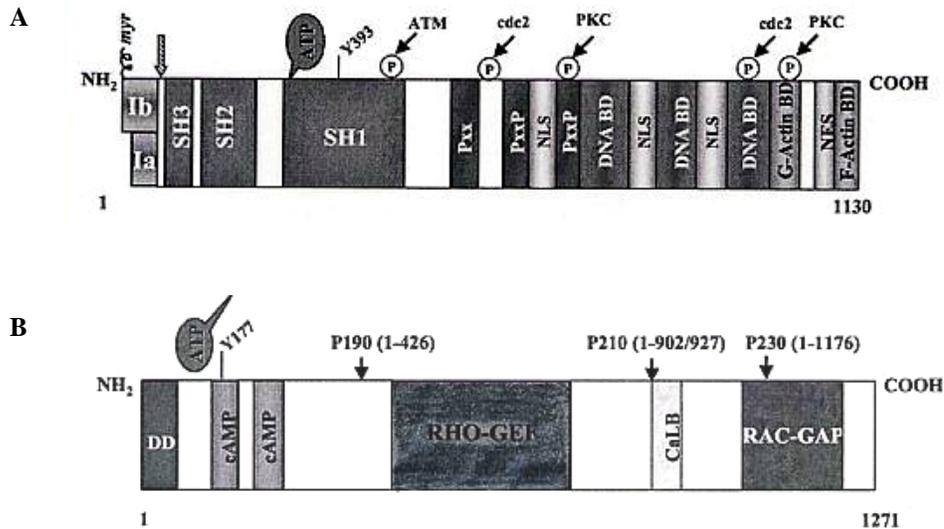
**Figura 3. Cromosoma Philadelphia.** El esquema muestra los cromosomas 9 y 22 normales, así como el segmento del cromosoma 22 adicionado al cromosoma 9 (9q+) y el cromosoma 22 acortado (22q-).

El gen ABL normal humano, es el homólogo al oncogen v-abl presente en el virus de la leucemia murina de Abelson, y codifica a una proteína tirosina cinasa no receptor con peso molecular de 145 kDa (**Figura 4A**). En su extremo amino terminal, la proteína Abl posee tres dominios SH (SH1-SH3). El dominio SH1 esta involucrado con su función tirosina cinasa, mientras que los dominios SH2 y SH3

le permiten interactuar con otras proteínas. El centro de la molécula presenta secuencias ricas en prolina, que son capaces de interactuar con dominios SH3 presentes en otras proteínas, mientras que el extremo carboxilo terminal tiene señales de localización nuclear, sitios de unión al ADN y sitios de exporte nuclear que le permiten oscilar entre el citoplasma y el núcleo, así como su asociación con la cromatina (Deininger et al, 2000; Sawyers, 1992).

Las funciones celulares de Abl han sido asociadas con apoptosis en respuesta a radiación ionizante y a inductores de daño al ADN. Estos agentes activan la actividad cinasa de Abl en núcleo y permiten realizar su función en el citoplasma mediante la activación de señales proapoptóticas inducidas por p73 (una proteína análoga a p53). Sin embargo, la función apoptótica de Abl se bloquea cuando ésta se encuentra asociada a la proteína del retinoblastoma (Rb). Estas funciones han ubicado a Abl como un agente regulador del ciclo celular en respuesta a daño y estrés genotóxico (Wang, 2000).

El gen BCR por su parte, codifica a una proteína ubicua de 160 kDa (**Figura 4B**), que posee un dominio amino terminal con actividad serina-treonina cinasa, cuyo único sustrato identificado es la proteína Bap 1, un miembro de la familia de proteínas reguladoras del ciclo celular 14-3-3 (Reuther et al, 1994). El dominio central de Bcr contiene una región que estimula el intercambio de GTP por GDP, mientras que el extremo carboxilo terminal tiene actividad GTPasa para Rac (un miembro de la superfamilia Ras, que regula la polimerización de actina). Sin embargo, aunque Bcr parece responder como transductor de señales, su verdadero papel biológico no ha sido determinado, aunque su participación en leucemias Ph positivas parece de relevante importancia (Diekmann et al , 1991; Deininger et al, 2000).

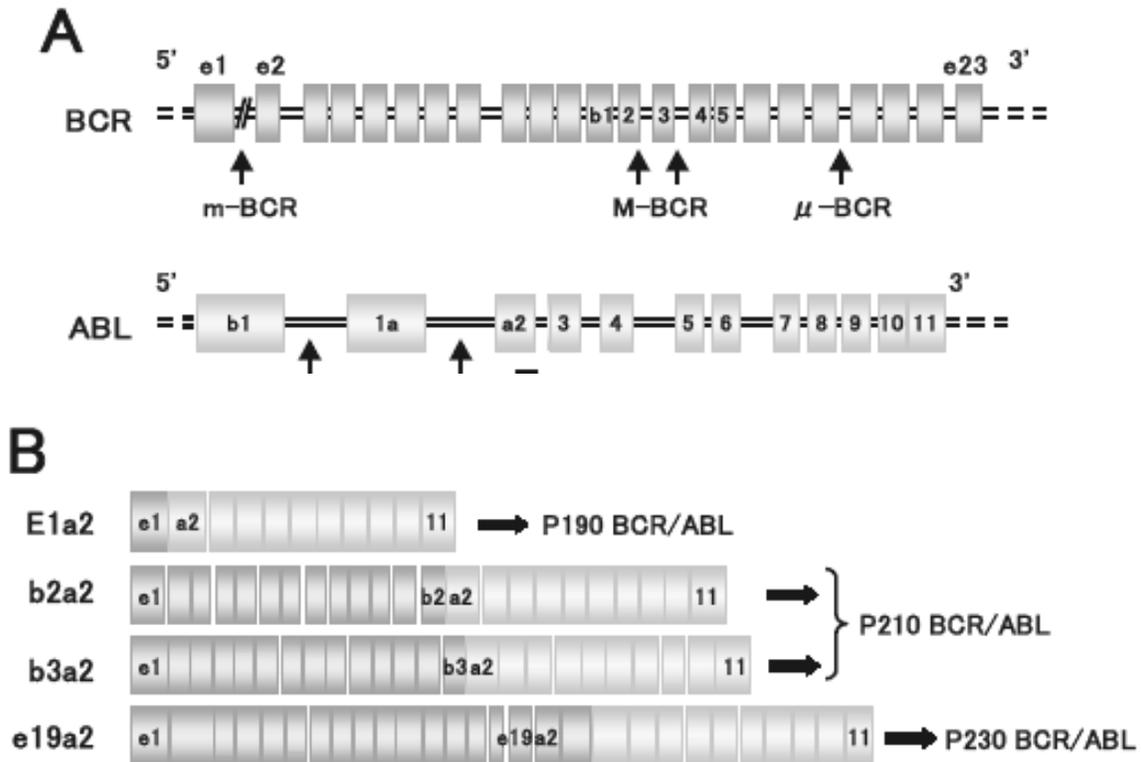


**Figura 4. Estructura y dominios funcionales de las proteínas Abl (A) y Bcr (B) normales.** (Ver texto para la descripción de cada uno de los dominios)

El punto de ruptura del gen ABL puede ocurrir en cualquier sitio a lo largo de un área de 300 kb en su extremo 5' (**Figura 5A**). Una primera posibilidad es corriente arriba del primer exón (Ib). Otro sitio es corriente abajo del segundo exón (Ia), aunque usualmente el sitio de ruptura se presenta entre éstos dos exones.

En contraste a Abl, los puntos de ruptura del gen Bcr se localizan en 3 diferentes regiones (**Figura 5A**). El primer sitio de ruptura de BCR, se ubica en un área de 5.8 kb entre los exones 12 y 16 (originalmente denominados exones b1-b5), referido como región de ruptura mayor (M-bcr), y dependiendo del splicing alternativo que se realice, puede generar los transcritos de fusión b2a2 o b3a2 (**Figura 5B**). Este tipo de transcritos codifica a una proteína de 210 kDa (p210<sup>Bcr-Abl</sup>), característica de los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica y de una tercera parte de los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). El resto de los pacientes con LLA presentan el transcrito e1a2, originado en un área de 54.4 kb por la ruptura en el exón e2 de Bcr, en el sitio conocido como región de ruptura menor (m-bcr), el cual codifica a una proteína de 190 kDa (p190Bcr-Abl). Finalmente, el transcrito e19a2 característico de leucemia neutrofilica crónica, se ubica en el exón e19 de Bcr en la región conocida como  $\mu$ -bcr y codifica a una

proteína de 230 kDa (p230Bcr-Abl) (**Figura 5C**) (Deininger et al, 2000; Jorgensen y Holyoake, 2001, Clarkson et al, 2003).



**Figura 5. Sitios de ruptura y translocación de Bcr-Abl.** (ver texto para la descripción de la figura).

Como se mencionó anteriormente, la LMC se caracteriza por la presencia del cromosoma Ph y en consecuencia del gen de fusión Bcr-Abl, el cual codifica para la oncoproteína p210<sup>Bcr-Abl</sup> (p210). Esta proteína, a diferencia de la proteína Abl normal se ubica preferencialmente en el citoplasma, en donde tiene una incrementada y constitutiva actividad tirosina cinasa, la cual es esencial para la transformación maligna (Calabretta y Perrotti, 2004).

La actividad tirosina cinasa de Bcr-Abl resulta de la delección del dominio SH3 de Abl, y tiene como consecuencia la autofosforilación de p210 en el residuo de tirosina 177 (Y177) (Pendergast et al, 1993). La expresión ectópica de p210 resulta en una independencia a factores de crecimiento y en la transformación

leucémica de líneas celulares hematopoyéticas. Aunado a ello, la expresión transgénica de p210 induce leucemia o enfermedades mieloproliferativas, indicando un papel directo y causal de Bcr-Abl en Leucemia Mieloide Crónica (Dash et al, 2002), ya que es capaz de activar numerosas vías de señalización que inducen al fenotipo leucémico.

#### Alteración de las propiedades de adhesión celular

La adhesión de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas al estroma medular, regula negativamente eventos de proliferación a través de la participación de integrinas, selectinas e inmunoglobulinas, siendo particularmente importantes las  $\beta$ -integrinas. Estas al unirse a su receptor, son capaces de inhibir la proliferación de células hematopoyéticas normales, además que se involucran en la regulación de la movilidad celular al unirse a moléculas de adhesión focal como paxilina, la cinasa de adhesión focal Fak, p130Cas y Hef-1 (Verfaillie et al, 1997).

No obstante, en LMC se detectan anomalías en la expresión de selectinas e integrinas, y se ha confirmado que células progenitoras Ph<sup>+</sup> se unen con menor afinidad al estroma que su contraparte normal. Aunado a ello, se ha demostrado que las células de LMC presentan una variante de  $\beta$ 1-integrina (inhibidora de la adhesión), que no se encuentra en su contraparte normal (Gordon et al, 1987; Zhao et al, 1997). Además de lo anterior, se sabe que p210 es capaz de inducir plegamiento (ruffling) en la membrana, aumentando con ello la movilidad celular, lo que favorece la mayor liberación de células indiferenciadas a la circulación sanguínea (Jorgensen y Holyoake, 2001).

#### Activación de señales mitogénicas

La constitutiva actividad cinasa de la proteína p210, conduce a un incremento en la capacidad proliferativa de las células de LMC. Esta actividad

esta mediada por múltiples vías de señalización, entre las que se encuentran: las proteínas RAS, las proteínas Stat y la vía del PI3-cinasa.

La vía de Ras, se activa constitutivamente por la interacción de Bcr-Abl con el complejo de proteínas de unión al receptor GRB2/Gab2, que al fosforilar el adaptador SHC, induce un incremento en el intercambio de nucleótidos de guanosina GDP/GTP, promoviendo la acumulación de GTP unido constitutivamente a RAS, evento que induce la excesiva proliferación celular (Sawyers et al, 1995).

Otra vía activada por p210 es la del transductor y activador de la transcripción 5 (STAT 5), el cual interactúa con el dominio SH2 de Bcr-Abl, lo que conduce a su translocación al núcleo, en donde funciona como un factor de transcripción, activando al gene antiapoptótico Bcl-XL y reduce la susceptibilidad a la apoptosis en células Ph+ (Horita et al, 2000).

El Fosfatidil-Inositol 3 cinasa (PI3-K por sus siglas en ingles), es otro blanco activado directamente por Bcr-Abl, ya que éste se une con la subunidad reguladora (p85) de PI3K y conduce a la activación y fosforilación de moléculas como BAD, MDM2 e I $\kappa$ B-cinasa. La activación de BAD suprime su actividad proapoptótica ya que permanece secuestrada en el citoplasma por la molécula 14-3-3b. La activación de MDM2 por su parte, incrementa su exporte nuclear y con ello induce una eficiente degradación de la proteína p53. Finalmente, la fosforilación de I $\kappa$ B cinasa incrementa la actividad de su sustrato I $\kappa$ B, el cual entonces esta sujeto a la degradación dependiente del proteasoma, lo que conduce a la liberación y translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, en donde actúa como factor de transcripción, evento que se ha asociado con la transformación maligna de células primarias de ratón (Calabretta y Perrotti, 2004; Rauther et al, 1998).

### Inhibición de la apoptosis

En LMC, mecanismos como la activación de PI3K (que induce la activación de BAD), y de STAT5 (que contribuye al incremento de Bcl-XL), son los

responsables directos de la resistencia a la apoptosis. No obstante, también se ha descrito que Bcr-Abl, es capaz de proteger de la apoptosis inducida por estrés mecánico y químico, y aunque el mecanismo no está totalmente entendido, se sabe que Bcr-Abl puede bloquear la liberación de Citocromo C de la mitocondria, e inducir la activación de caspasas (Shet et al, 2002; Amarante et al, 1998; Gutiérrez-Castellanos et al, 2004).

## Eventos genéticos

Asociado a las alteraciones antes descritas, en la gran mayoría de pacientes con LMC se presentan cambios moleculares y citogenéticos asociados con la evolución de la enfermedad. Aproximadamente entre el 70 y 80% de los pacientes presentan cambios cromosomales que involucran a los cromosomas 8, 17, 9 y 22 (Shet et al, 2002).

En el cromosoma 8q24 se ubica el gen MYC, y se ha demostrado que en los pacientes con LMC existe una sobre expresión de esta molécula asociado a la trisomía 8, la cual es más común en la crisis blástica de la enfermedad (Jennings y Mills, 1998).

Aunado a lo anterior, se ha demostrado que en el 25% de los pacientes en crisis blástica, existen mutaciones, deleciones o rearrreglos en el cromosoma 17, el cual involucra alteraciones en el gen p53, lo que causa a su vez alteraciones en la regulación del ciclo celular (Schutte et al, 1993).

Otro gen frecuentemente involucrado en la progresión de la LMC, es p16 INK4, que se encuentra en el cromosoma 9 y que junto con el cromosoma 22 adquieren deleciones adicionales en las secuencias que flanquean el sitio inicial de la translocación, provocando la progresión de la leucemia. Asociado a este hecho, se ha sugerido la presencia de un doble cromosoma Ph en las últimas fases de la enfermedad, evento que conduce al incremento en la expresión de la proteína Bcr-Abl y a los efectos que esto conlleva (Sill et al, 1995; Shet et al, 2002).

### **2.3. Opciones terapéuticas en LMC**

Como en cualquier enfermedad, la eficiencia de una terapia esta dada por la tasa de sobrevida en los pacientes, y particularmente en el caso de la LMC, se han empleado los términos remisión hematológica, respuesta citogenética y remisión molecular para conocer el grado de avance y control del padecimiento.

Remisión Hematológica Completa (CHR- por sus siglas en inglés): Definida como la cuenta normal de células sanguíneas (incluyendo las células blancas), así como la desaparición completa de signos y síntomas de la enfermedad.

Respuesta Citogenética Completa (CCR- por sus siglas en inglés): Referida también como Respuesta Citogenética Mayor, indica la ausencia total de metafases Ph+ empleando ensayos de citogenética clásica. Una Respuesta Citogenética Parcial o Menor, implica la presencia de 1 a 35% de metafases Ph+.

Remisión Molecular: Se emplea para designar que no existen transcritos Bcr-Abl detectables por técnicas moleculares altamente sensibles como RT-PCR. Sin embargo, existe el consenso que la negatividad de Bcr-Abl debe tener como límite de detección 1 célula positiva en  $10^5$  a  $10^6$  células normales (Druker, 2001).

El primer tratamiento efectivo para la LMC fue la Solución de Fowler's, la cual contenía arsénico como componente activo principal y fue utilizada a principios del siglo XIX. Posteriormente entre los años 1920 y 1930 y con el advenimiento de la radioterapia, la irradiación al bazo fue la principal opción terapéutica, ya que ofrecía a los pacientes la disminución de la sintomatología, aunque no prolongaba su vida.

En 1953, el busulfan se empleó en el tratamiento contra la LMC. Dicho compuesto es un agente alquilante, extremadamente tóxico para las células progenitoras hematopoyéticas, el cual ofrece beneficio en la sobrevida de los pacientes, por lo que el busulfan es actualmente empleado en regímenes de preparación para trasplante alogénico de médula ósea (Deininger y Druker, 2003).

Las siguientes drogas efectivas en el tratamiento de la LMC fueron la hidrea y el arabinosido de citocina, las cuales presentan menor efecto tóxico que el busulfan. Su efecto principal es destruir las células proliferantes, aunque son incapaces de inducir remisiones citogenéticas, excepto cuando se usan a muy altas dosis, lo que causa gran toxicidad y daño no selectivo en células normales en división.

A principios de los años 80's el Interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) fue introducido como tratamiento principal en la LMC (Tsao et al, 2002). Este agente produce CHR en el 80% de los pacientes, y CCR en el 26% de los mismos si es empleado durante la fase crónica de la enfermedad, y al ser utilizado en combinación con arabinosido de citocina se obtienen mejores resultados, alcanzando el 91% de CHR y el 58% de CCR.

El uso del IFN- $\alpha$ , presenta limitaciones en su biodisponibilidad, ya que es detectado en el plasma de los pacientes durante las primeras 4 a 6 horas posteriores a su administración, y es prácticamente indetectable a las 24 horas. Esta limitada disponibilidad biológica ha conducido a modificar el IFN- $\alpha$  mediante su unión covalente con una molécula de polietilen-glicol de 40 kDa, lo que resulta en un componente de baja tasa de absorción con una vida media de aproximadamente 70 horas, el cual se ha denominado Interferón alfa pegilado (PEG-IFN- $\alpha$ ). Esta molécula permanece en el plasma de los pacientes una semana después de su administración, y ha mostrado tener efectos aún en pacientes que eran resistentes al efecto del IFN- $\alpha$  estándar (Talpez, 2001).

En 1993, se sugirió que era posible diseñar un componente específico para el tratamiento de leucemias humanas asociadas a Abl (Anafi et al, 1993), y en 1996 se reportó a la 2-fenil-amino-pirimidina como el primer inhibidor específico de la cinasa Abl. Dicho inhibidor fue optimizado y dio lugar al Inhibidor de la transducción de señales número 571 (STI571) formalmente nombrado CGP57148-B. Esta molécula es capaz de inhibir la autofosforilación de las cinasas de Abl, el receptor de PDGF y el receptor c-Kit. Esta inhibición se debe a que el STI571 ocupa específicamente el sitio de unión de ATP en el dominio cinasa de las

diferentes proteínas, evitando con ello la fosforilación de los sustratos activados corriente abajo por Bcr-Abl (Druker y Lydon, 2000).

La fase I de los estudios clínicos con STI571, ahora llamado comercialmente Gleevec (IMATINIB; Gleevec® , Novartis Pharmaceuticals), fueron iniciados en Estados Unidos en 1998, al administrar por vía oral 300 mg diarios del compuesto en pacientes que habían sido resistentes a la terapia con IFN- $\alpha$ . Las primeras evaluaciones clínicas mostraron que el 50% de los pacientes con CML en fase crónica se encontraban en remisión hematológica y en todos los casos se mostraba cierta respuesta citogenética. Aunado a ello, en pacientes con CML en crisis blástica, se detectó una desaparición del número de blastos en circulación y en infiltrados extramedulares (Goldman, 2000; Sawyers, 2001).

En estudios en fase II con STI571, se ha demostrado que al administrar diariamente 400 mg/kg de peso en pacientes que habían sido refractarios o intolerantes a IFN- $\alpha$ , se presenta una remisión hematológica completa de aproximadamente el 95%, encontrando respuesta citogenética completa en el 41% de ellos (Clarkson et al, 2003).

Sin embargo, a pesar de los avances en el tratamiento de la LMC y de los resultados obtenidos en las fases I y II del estudio con Gleevec, aún existen importantes interrogantes acerca del uso de esta droga, por lo que la única opción curativa para este padecimiento es el trasplante alogénico de células hematopoyéticas.

A este respecto, se conoce que pacientes que recibieron trasplante alogénico de células hematopoyéticas, tienen una supervivencia libre de enfermedad entre el 50 y 80%, aunque inconvenientemente el trasplante está limitado a pacientes que tienen un donador apropiado y son clínicamente aptos para tolerar el procedimiento médico (que incluye altas dosis de quimioterapia y radiación total en el cuerpo). No obstante, en pacientes no aptos para recibir un trasplante convencional, existe el trasplante no mieloablativo, que por no recibir las dosis normales de quimioterapia, resulta menos tóxico, aunque no es claro si los resultados de este trasplante son iguales a los del trasplante convencional (Goldman, 2000; Clarkson et al, 2003).

#### **2.4. Subpoblaciones hematopoyéticas de Leucemia Mieloide Crónica.**

Se ha descrito que la LMC es una enfermedad hematológica originada en las CTH, evento que tienen como consecuencia la producción de células maduras anormales que son indistinguibles de sus contrapartes normales, por lo que el diagnóstico definitivo de la enfermedad se basa en la demostración citogenética y molecular de la presencia del cromosoma Ph y la proteína Bcr-Abl.

La caracterización genotípica de LTC-IC, provenientes de pacientes leucémicos en la primera fase de la enfermedad, ha demostrado la presencia de células Ph+, así como de una población residual normal. En estos estudios se logró demostrar que la población Ph+, (dominante al inicio de los cultivos) tiende a desaparecer, mientras que la población normal se incrementa con el curso del tiempo del cultivo (Coulombel et al, 1983). Además, se ha demostrado que las LTC-IC Ph+ provenientes de sangre periférica o médula ósea leucémica, se eliminan más rápido que su contraparte normal, cuando son cultivadas en presencia de capas alimentadoras de fibroblastos (Udomsakdi et al, 1992).

En un intento por distinguir las células normales y leucémicas en los LTC-IC, se encontró que las células CD34+HLA-DR- están altamente enriquecidas en LTC-IC y CFC Ph-/Bcr-Abl-, en contraste con la subpoblación CD34+HLA-DR+ (Verfaillie et al, 1992), sin embargo, no existe hasta el momento una característica inmunofenotípica que permita distinguir entre la población residual normal y la población leucémica, aunque si se han podido demostrar algunas alteraciones que explican la permanencia de la subpoblación anormal.

A este respecto, se ha reportado que el 90% de LTC-IC normales se encuentran en estado quiescente, mientras que el mismo porcentaje de LTC-IC leucémicas se encuentran en estado proliferativo (Holyoake et al, 2002). Además, se ha reportado que células CD34+ provenientes de pacientes con LMC al ser cultivadas en presencia de SCF (100 ng/ml) o IL-3 (100 ng/ml), presentan ciclos celulares más cortos que su contraparte normal (Traycoff et al, 1998), e

incluso se sabe que esta misma subpoblación celular es capaz de secretar al medio GM-CSF (en concentración de picogramos), e inducir con ello la proliferación celular (Jonuleit et al, 1998).

Aunado a lo anterior, se ha descrito que adicionar 100 ng/ml de SCF a subpoblaciones de células CD34+, provoca un incremento en la proliferación celular, mientras que en la subpoblación más primitiva CD34+CD38-, se induce la supervivencia y la expansión de unidades formadoras de colonias de Granulocitos-Macrófagos (Moore et al, 1998). Cabe mencionar que poblaciones leucémicas CD34+ altamente enriquecidas en células que se encuentran en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, al ser transplantadas en ratones inmunodeficientes y sin haber recibido ningún tipo de estimulación, son capaces de salir de la quiescencia y generar un comportamiento leucémico en los ratones (Holyoake et al, 1999).

Una probable explicación a la proliferación de células leucémicas que no han recibido estímulos mitogénicos, es la producción autócrina de factores de crecimiento. Este hecho ha sido demostrado en células de LMC CD34+ (Jiang et al, 1999; Holyoake et al, 2001) y en líneas celulares humanas y de ratón immortalizadas con Bcr-Abl, las cuales pueden producir y secretar IL-3 y GM-CSF, adquiriendo con ello la capacidad de inducir su propia proliferación (Inukai et al, 2000; Deininger et al, 2000). La manera en la que las líneas celulares Bcr-Abl positivas regulan su proliferación parece estar mediada por una reducción en la expresión de moléculas inhibitorias del ciclo celular, así como por el acortamiento de sus fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Cortez et al, 1997; Jonuleit et al, 2000) y por la estimulación en la expresión de moléculas de señalización como las cinasas activadas por mitógenos (MEK), la familia de proteínas RAS y el adaptador Grb2 (Morgan 2001 et al; Delgado et al, 2000; Million y Van Etten, 2000).

Otra alteración detectada en subpoblaciones hematopoyéticas de LMC es la pérdida de adhesión celular al estroma de la médula, evento que provoca que células progenitoras y precursoras inmaduras sean detectadas prematuramente en la circulación sanguínea, principalmente en la crisis blástica de la enfermedad. A este respecto se ha demostrado que la subpoblación CD34+ lin-HLA-DR+ leucémica, presenta una reducida adhesión a fibronectina, a pesar de tener

niveles normales de expresión de las subunidades de integrinas  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 1$  (Jorgensen y Holyoake, 2001). Sin embargo, se ha demostrado que en células CD34+ de LMC la proteína inhibidora del ciclo celular p27 se ubica preferencialmente en el citoplasma celular, lo que evita la interacción con la cinasa dependiente de ciclina 2 (cdk2) en el núcleo, y con ello la falta de adhesión al estroma y la prematura proliferación celular (Jiang et al, 2000; Zhao et al, 2001).

Aunado a lo anterior, algunos receptores a integrinas como  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 1$  son capaces de interactuar con colágenas y laminas, que son expresados en subpoblaciones de progenitores leucémicos pero no en progenitores normales, indicando que la liberación prematura de progenitores de LMC a circulación puede ser causada por la pérdida de interacciones a fibronectina y la adquisición de interacciones adhesivas con componentes de la membrana basal (Lundell et al, 1997). Además, se ha reportado que células CD34+ de LMC y líneas celulares transfectadas con Bcr-Abl presentan plegamiento en sus membranas y formación de filopodios, lo que contribuye a la incrementada motilidad celular detectada en la LMC (Petzer y Gunsilius, 2003).

Las características propias de la LMC indican que son las CTH las portadoras de la transformación inicial, por lo que en años recientes se ha hecho necesario que el control de este padecimiento se involucre con el estudio de las subpoblaciones hematopoyéticas más primitivas.

## **2.5. Hematopoyesis después de terapia**

Como antes se describió la LMC ha sido tratada clínicamente con diversas drogas citotóxicas, como la hidroxycurea y el busulfan, que controlan la cuenta de células blancas, aunque no retardan la progresión de la enfermedad (Marley et al, 2000).

El IFN- $\alpha$  por su parte, puede provocar alguno de los siguientes eventos: generar toxicidad selectiva contra la clona leucémica, incrementar la regulación

inmune, y/o modular la hematopoyesis a través del microambiente hematopoyético (Dowding et al, 1993).

Con relación a la toxicidad selectiva, se sabe que el IFN- $\alpha$  es capaz de inhibir cultivos a largo plazo provenientes de pacientes con LMC en fase crónica, además de que después de 8 semanas en cultivo, reduce el porcentaje de células Ph+ (Cornelissen et al, 1998). Aunado a lo anterior, se sabe que el Interferón alfa puede proteger de la progresión a la crisis blástica, al tiempo que inhibe la proliferación de progenitores mieloides maduros y progenitores eritroides inmaduros (Despres et al, 1995; Marley et al, 2000). El IFN- $\alpha$ , es también capaz de inhibir la proliferación de células CD34+ a través de la interacción directa con su propio receptor, sin utilizar mecanismos accesorios. Además la cantidad de receptores presentes en dichas células, se incrementa conforme avanza la diferenciación, lo que ha explicado la buena respuesta terapéutica obtenida en algunos pacientes (Ito et al, 2004).

En relación con la regulación inmune, se sabe que el IFN- $\alpha$  es capaz de disminuir o promover la síntesis de anticuerpos, además de que es un potente estimulante inmune y activador de células dendríticas, células naturales asesinas y células T citotóxicas, todas ellas capaces de generar respuesta antitumoral. Aunado a lo anterior, se ha descrito que en células Bcr-Abl positivas es capaz de inducir un estado de dormancia tumoral y de controlar la fase crónica, sin necesidad de aplicar otra terapia (Gabriele et al, 2004; Talpaz, 2001).

Otro efecto inducido por IFN- $\alpha$  es modular la hematopoyesis a través del microambiente, lo cual se logra al restaurar la adherencia al estroma de células CD34+ mediante la inducción de moléculas como L-selectina,  $\beta$ -2-integrina, ICAM-1 e ICAM3 (Martín-Henao et al, 2000). Así mismo, cuando se usa IFN- $\alpha$  en combinación con oligodeoxinucleótidos antisentido contra Bcr-Abl, se puede incrementar la adhesión de líneas celulares Bcr-Abl+ al estroma, alcanzando niveles de adhesión similares a los detectados en MON (Belluci et al, 1999).

Por otra parte, en lo que respecta a STI571, estudios *in-vitro* han mostrado que esta molécula es capaz de inhibir el crecimiento de líneas celulares que expresan Bcr-Abl (Druker et al, 1996; Carroll et al, 1997; Benjamín et al, 2002),

efecto que en algunas de ellas se logra gracias a la inhibición de vías de señalización como JAK5-STAT y PI3 cinasa (Kindler et al, 2003).

Aunado a lo anterior Gambacorti-Passerini et al, (2001), demostraron que el STI571 puede inhibir CMN de LMC, obtenidas tanto en fase crónica como en crisis blástica. Así mismo, es capaz de reducir el número de colonias provenientes de SPM y Médula Osea de pacientes con CML en fase crónica (Marley et al, 2000), así como de inhibir la proliferación y el ciclo celular de progenitores primitivos CD34+CD38- y células comprometidas CD34+CD38+, sin alterar el comportamiento de células normales (Holtz et al, 2002).

Este último punto se contrapone con lo descrito por Dewar (2003) quien menciona que el STI571 inhibe el desarrollo *in-vitro* de progenitores monocito-macrófago, así como la proliferación dosis-dependiente de células CD34+ y CFC provenientes de MON, sin tener efecto en células formadoras de áreas cobblestone (Bartolovic et al, 2004).

Cabe mencionar que en estudios realizados por Holyoake, se había demostrado que en los pacientes con LMC existía una rara subpoblación CD34+ altamente quiescente en la que la mayoría de las células eran Ph+, capaces de entrar a un estado proliferante en donde incluso se podía detectar la presencia de IL-3 (Holyoake et al, 1999; Holyoake et al, 2001). Dichas células son insensibles al efecto de STI571, e incluso pueden permanecer viables y quiescentes aún en presencia de factores de crecimiento, lo que indica que existe resistencia de la población leucémica al efecto inhibitorio de STI571 (Graham et al, 2002).

Esta resistencia tumoral también ha sido reportada por Bathia et al (2003), quien indica que el STI571 suprime pero no elimina los progenitores primitivos malignos en LMC, y que incluso permanecen en los pacientes después de haber obtenido respuestas citogenéticas completas.

Actualmente se sabe que la efectividad del STI571 puede variar de acuerdo con el estado de diferenciación de su célula blanco, ya que se ha descrito que Bcr-Abl puede ser más fácilmente inhibida en progenitores mieloides que en células menos maduras (Sawyers, 2001).

Otro mecanismo asociado a la resistencia a STI571, es la sobre expresión de genes de resistencia a multidroga y sus productos proteicos, tal y como sucede cuando el gen MDR1 es introducido y sobre expresado en las líneas celulares Bcr-Abl positivas: AR230r, LAMA84r, y K562r (Bubnoff et al, 2003; Mahon et al, 2003).

Además de lo antes mencionado, también se ha demostrado que las células Ph+ tienen una alta inestabilidad genómica, lo que puede provocar la amplificación del gene Bcr-Abl, mutaciones puntuales en el dominio cinasa de Bcr-Abl y cambios genéticos adicionales, que contribuyen con la evolución leucémica (Barthe et al, 2002; Roumiantsev et al, 2002; Bubnoff et al, 2003).

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha descrito que la LMC es una enfermedad clonal originada en una célula hematopoyética altamente primitiva, que presenta las siguientes características: capacidad de regular su proliferación de forma autócrina a través de la secreción de moléculas como IL-3 y G-CSF; tener ciclos celulares cortos que favorecen el incremento de la población anormal; mantener una pequeña población en estado quiescente (fase G0 del ciclo celular) que confiere la capacidad de resistir el efecto de agentes citotóxicos, pero que al ser trasplantada en ratones inmunodeficientes, tiene la capacidad de generar un comportamiento leucémico en el que se detectan células Bcr-Abl positivas.

La presencia de Bcr-Abl como marcador de la LMC ha servido para tratar de identificar el origen de la patología, pero a pesar de que éste es probablemente el padecimiento hematológico mas ampliamente descrito, existen importantes interrogantes acerca de su biología básica. Algunos interrogantes son:

- ¿Cuál es la subpoblación de CTH que presenta inicialmente la translocación 9:22?
- ¿Cuál es el efecto de diferentes combinaciones de citocinas en la capacidad proliferativa y de expansión de las CTH de LMC?
- ¿Existe algún momento en el proceso de maduración hematopoyética en el que la población leucémica se pierda y solo permanezca la hematopoyesis normal?
- ¿Cómo afectan las opciones terapéuticas al comportamiento de las diferentes subpoblaciones hematopoyéticas de LMC y a la población residual normal?
- ¿Se podría generar *in-vitro* alguna condición de cultivo que permita purgar, enriquecer y expandir la población residual normal de pacientes con LMC?, etc.

Todas las cuestiones antes mencionadas hacen del estudio de la LMC un campo fértil en la generación de información, por lo que con el objeto de enriquecer el conocimiento sobre la hematopoyesis normal y leucémica, el presente trabajo se enfocó en dar respuesta a algunas de las interrogantes antes descritas.

## V. OBJETIVOS

### Objetivos Generales

- Caracterizar el potencial proliferativo y de expansión de células troncales y progenitoras hematopoyéticas presentes en Médula Osea de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica, antes y después de tratamiento
- Determinar la persistencia de las células que presentan, o no, la translocación (9:22), en poblaciones de células troncales y progenitoras hematopoyéticas en LMC en cultivos suplementados con diferentes citocinas.

### Objetivos Particulares:

- Determinar el potencial proliferativo y de expansión de las poblaciones primitivas CD34+CD38-lin<sup>-</sup> y CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>, provenientes de pacientes con leucemia mieloide crónica, en fase crónica, así como de médula ósea normal, estimuladas con diferentes citocinas (GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-6, EPO, TPO, SCF y Flt3-L).
- Evaluar la presencia del rearrreglo BCR-ABL en las poblaciones celulares primitivas CD34<sup>+</sup>CD38-lin<sup>-</sup> y CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>.
- Determinar la presencia de subpoblaciones BCR-ABL positivas y negativas, dentro de las poblaciones CD34<sup>+</sup>CD38-lin<sup>-</sup> y CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>, bajo diferentes días y condiciones de cultivo.
- Establecer si el tratamiento de pacientes con STI571 así como con IFN- $\alpha$  modifican el potencial proliferativo y de expansión de las poblaciones celulares CD34+LIN<sup>-</sup> y CD34+CD38-LIN<sup>-</sup>.
- Determinar si el tratamiento *in vivo* con STI571 ó INF- $\alpha$ , modifica la presencia de subpoblaciones BCR-ABL positivas o negativas en las subpoblaciones CD34+LIN<sup>-</sup> y CD34+CD38-LIN<sup>-</sup>.
- Determinar si el TNF $\alpha$  es capaz de inhibir la proliferación y expansión de Células Hematopoyéticas Primitivas de Pacientes con LMC.

## **HIPOTESIS**

Es conocido que la LMC se origina en una célula troncal hematopoyética que presenta la translocación Bcr-Abl y que en consecuencia es capaz de dar origen in vivo a una progenie con capacidades de proliferación, diferenciación, expansión y muerte anormales. Sin embargo, el comportamiento biológico in vitro de las subpoblaciones CD34+lin- y CD34+CD38-lin- de pacientes con LMC antes y después de recibir algún tipo de tratamiento no ha sido descrita.

En este trabajo se espera que dichas subpoblaciones hematopoyéticas provenientes de pacientes con LMC virgen de tratamiento tengan incrementadas sus capacidades de proliferación y expansión en presencia de diferentes combinaciones de citocinas, en relación a su contraparte normal. Así mismo es de esperarse que cuando las células provengan de pacientes que han recibido algún tipo de tratamiento, las capacidades de proliferación y expansión se recuperen y tengan un comportamiento similar a las muestras provenientes de MON.

## VI. MATERIALES Y METODOS.

### 1. Pacientes y Obtención de Muestras

Las muestras de Médula Osea de Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y Normal (MON) empleadas en este estudio, fueron colectadas de acuerdo con los lineamientos institucionales aprobados por las comisiones de ética en los Hospitales Centro Médico Nacional La Raza y Centro Médico Nacional Siglo XXI, considerando los siguientes criterios de inclusión:

Las muestras de MON (n=5) se obtuvieron de sujetos sanos entre 20 y 45 años de edad, incluidos como donadores en protocolos de trasplante alogénico de Médula Osea.

Las muestras de LMC virgen de tratamiento (n=12), se obtuvieron de aspirados de médula ósea de pacientes con diagnóstico reciente de LMC en fase crónica, vírgenes de tratamiento y positivos citogenéticamente al cromosoma Philadelphia.

Las muestras de LMC tratadas con IFN- $\alpha$  (n=5), fueron obtenidas de sujetos en remisión hematológica completa y respuesta citogenética parcial, que habían recibido Interferón- $\alpha$  (IFN®; Intron, Schering-Plough), a  $5 \times 10^6$  U/m<sup>2</sup>/día, después de 9 a 16 meses de tratamiento.

Las muestras de LMC tratadas con STI571 (n=8), se obtuvieron de pacientes que habían sido refractarios al tratamiento con IFN- $\alpha$ , y se habían sometido a tratamiento con dicho agente (IMATINIB®; Gleevec , Novartis Pharmaceuticals) con dosis de 200 a 400 mg/día, durante 4 a 6 meses. Todos los pacientes se encontraban en remisión hematológica y con respuesta citogenética mayor.

En el caso de las muestras de LMC postrasplante (n=8), éstas procedían de pacientes que habían recibido trasplante alogénico de células hematopoyéticas. En tres de los casos las células hematopoyéticas donadas se obtuvieron de médula ósea, mientras que las cinco restantes eran de sangre periférica

movilizada. En el momento del estudio, todos los pacientes se encontraban en remisión hematológica completa y mostraban respuesta citogenética mayor.

## 2. Separación de Células Hematopoyéticas

Las células del “Buffy Coat” (de médula ósea leucémica y normal) fueron obtenidas por centrifugación a 400 g durante 7 minutos, para posteriormente obtener la población de células mononucleares de baja densidad (<1.077g/ml), mediante gradiente de Ficoll (Pharmacia Biotech). Las células obtenidas, fueron resuspendidas en Medio Iscove’s modificado por Dulbecco (IMDM) suplementado al 2% con Suero Fetal Bovino (FBS) (StemCell Technologies). El número total de células nucleadas y viables, fue determinado mediante conteo con hemocitómetro, usando solución de Turk y azul tripano, respectivamente.

A partir de las CMN, se procedió a obtener las dos subpoblaciones enriquecidas en células CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> y CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>lin<sup>-</sup> mediante columnas de selección negativa. La técnica consistió en incubar entre 40-100x10<sup>6</sup> CMN durante 15 minutos y a temperatura ambiente, con un cóctel de anticuerpos primarios de eliminación de linaje (dependiendo de la subpoblación a enriquecer), para enseguida incubar durante otros 15 minutos a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario conjugado con un coloide magnético.

Después de la incubación, las células se hicieron pasar a través de una columna inmunomagnética en la que las células marcadas con los anticuerpos de linaje permanecieron adheridas a la columna, mientras que las células que no presentaron marcador de linaje, fueron obtenidas en Solución Salina de Fosfatos (PBS) al 10% de SFB en el volumen de elusión. Con este procedimiento se obtuvieron las poblaciones celulares enriquecidas en células CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> o CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>lin<sup>-</sup>, las cuales se contaron mediante hemocitómetro, usando azul de tripano y se sembraron en las condiciones de cultivo que se describen posteriormente.

Los cócteles de anticuerpos empelados para las dos diferentes subpoblaciones fueron:

Para enriquecer la subpoblación CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>: anti CD2, anti CD3, anti CD14, anti CD16, anti CD19, anti CD29, anti CD56, anti CD66b y anti glicoforina A (StemCell Technologies).

Para enriquecer la subpoblación CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>lin<sup>-</sup>: anti CD2, anti CD3, anti CD14, anti CD16, anti CD19, anti CD29, anti CD36, anti CD38, anti CD45RA, anti CD56, anti CD66b y anti glicoforina A (StemCell Technologies).

### 3. Cultivos Líquidos

Cien mil células de cada una de las poblaciones (CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> o CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>lin<sup>-</sup>) fueron sembradas en medio de cultivo Stem Span (medio IMDM suplementado con albúmina sérica bovina al 1%, 10 µg/ml de insulina pancreática bovina, 200 µg/ml de transferrina humana, 10<sup>-4</sup> M de 2-mercaptoetanol y 2 mM de L-glutamina) (StemCell Technologies), suplementado con diferentes combinaciones de citocinas, y mantenidas a 37°C en un ambiente saturado de humedad al 5% de CO<sub>2</sub>.

Cada 5 días el número total de células fue contado mediante el uso de un hemocitometro, para tomar nuevamente 100x10<sup>3</sup> células, las cuales se volvieron a sembrar en las mismas combinaciones de citocinas, realizándose el mismo procedimiento mientras había células en los cultivos.

Las combinaciones de citocinas empleadas en este trabajo fueron:

- Combinación control: Medio de cultivo Stem Span sin suplemento de citocinas.
- Combinación seminal: Medio de cultivo Stem Span mas 10 ng/ml de Factor de Células Seminales (SCF) (StemCell Technologies), 10 ng/ml de Interleucina 6 (IL-6) (StemCell Technologies), 10 ng/ml de Trombopoyetina (Tpo) (StemCell Technologies) y 10 ng/ml del Ligando de Tirosina Fetal 3 (Flt3 L) (StemCell Technologies).

- Combinación mixta: Medio de cultivo Stem Span mas 10 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de IL-6, 10 ng/ml de Tpo, 10 ng/ml de Flt3 L, 10 ng/ml de Interleucina 3 (IL-3) (StemCell Technologies), 10 ng/ml de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Monocitos (GM-CSF) (Molgramostim, Novartis/Schering-Plough), 20 ng/ml de Factor Estimulante de colonias de Granulocitos (G-CSF) (StemCell Technologies) y 3 U/ml de Eritropoyetina (Epo) (Eprex; Johnson & Johnson).
- Combinación control más Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (StemCell Technologies): Combinación control + 10 ng/ml de TNF $\alpha$ .
- Combinación seminal más TNF $\alpha$ : Combinación seminal + 10 ng/ml de TNF $\alpha$ .
- Combinación mixta más TNF $\alpha$ : Combinación mixta + 10 ng/ml de TNF $\alpha$ .

Una vez finalizados los cultivos, se realizó el cálculo del incremento celular total, multiplicando el número celular contado en determinado día y condición de cultivo por el número celular acumulado en los días previos de la misma condición de cultivo.

#### 4. Inmunocitoquímica

En el día cero, así como en los diferentes días y condiciones de cultivo,  $35 \times 10^3$  CMN, células CD34+lin- o CD34+CD38-lin- fueron preparadas en laminillas, con la finalidad de determinar el porcentaje de células CD34+. Para ello, se utilizó un paquete comercial (DAKO En Vision+ System, Peroxidasa-Diaminobencidina) y un anticuerpo monoclonal específico contra el antígeno CD34 (DAKO). El ensayo fue revelado con Diamino-Benzidina, y el porcentaje de células CD34+ (en cualquiera de las subpoblaciones), se determinó después de contar 300 células por laminilla.

## 5. Cultivos semisólidos

El número de células formadoras de colonias (CFC) presente en los diferentes días y condiciones de cultivo fue evaluado mediante cultivos semisólidos. Para ello, 50,000 CMN, 1000 células CD34+lin- o 1000 células CD34+CD38-lin-, fueron sembradas en metil-celulosa al 0.9% suplementada con 30% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1% de albúmina sérica bovina,  $10^{-4}$ M de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 50 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de IL-3, 10 ng/ml de GM-CSF y 3 U/ml de Epo (Stem Cell Technologies). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en un ambiente saturado de humedad al 5% de CO<sub>2</sub> durante 14 días, al final de los cuales las colonias fueron evaluadas y clasificadas en los siguientes linajes hematopoyéticos:

- Eritroide: Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU-E) y Unidades Formadoras de Colonias de Brote Eritroide (BFU-E): Colonias hemoglobinizadas con grupos celulares menores o mayores a 50 células respectivamente.
- Mieloide: Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos (CFU-G): Colonias que contenían células granulocíticas; Unidades Formadoras de Colonias Macrófagos (CFU-M): Colonias que contenían células macrofágicas; y Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM): Colonias que contenían células tanto granulocíticas como macrofágicas.
- Mixto (CFU-Mix): Colonias que presentaron células tanto mieloides como eritroides.

La expansión celular (definida por la capacidad que tienen las CSH y CPH de generar células con características semejantes a ellas mismas), fue evaluada mediante la capacidad de generar CFC, en cultivos semisólidos, en los diferentes días y condiciones de cultivo.

El cálculo de expansión celular fue evaluado cada 5 días al tomar una alícuota de  $1-5 \times 10^3$  células obtenidas en cada uno de los cambios de medio

realizados a los diferentes días y condiciones de cultivo. Dichas células fueron sembradas y cultivadas en las condiciones arriba descritas, para que al cabo de los 14 días de cultivo el número de colonias detectadas se extrapolara al número celular total acumulado evaluado en los ensayos de proliferación celular.

## 6. Expresión del rearreglo Bcr-Abl

### 6a) Extracción de ARN

El ARN procedente de las diferentes muestras (MON, LMC sin tratamiento, LMC post IFN $\alpha$ , LMC post IMATINIB y LMC post TCH) a diferentes días y condiciones de cultivo, fue extraído de la siguiente manera:

Se adicionaron 750  $\mu$ l de TRIPURE (Roche) al botón celular (que contenía entre 500,000 y  $3 \times 10^6$  células), hasta resuspender completamente. Enseguida se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó durante 15 segundos y la muestra se mantuvo de 2 a 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C, (en este punto se formaron 3 fases: la fase orgánica inferior que contenía DNA, la interfase en la que se encontraban proteínas y la superior en donde se encontraba el ARN), para finalmente recuperar la fase acuosa superior, a la que se adicionaron 500  $\mu$ l de isopropanol. La muestra se mantuvo entonces a temperatura ambiente durante 10 minutos para enseguida centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C para finalmente decantar el sobrenadante.

El ARN obtenido se lavó, adicionando 750  $\mu$ l de Etanol al 75%, el cual fue mezclado gentilmente para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. Este lavado se repitió durante 2 veces, para finalmente decantar el etanol y secar el ARN durante 15 minutos como máximo.

Una vez obtenido el ARN, éste se disolvió en 20  $\mu$ l de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) (Roche) y de este volumen se tomó una alícuota de

1  $\mu$ l para cuantificar el ARN y 9  $\mu$ l para verificar la calidad de la molécula en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. El volumen restante de ARN se utilizó para determinar la presencia del rearrreglo Bcr-Abl.

#### 6b) Transcripción Reversa (RT)

Del ARN obtenido, se utilizaron entre 500 y 1500 ng de ARN para generar c-DNA mediante transcripción reversa. Para ello se utilizaron Random Primers (Invitrogen) y la enzima M-MLV Reverso Transcriptasa (Invitrogen), siguiendo el siguiente procedimiento:

Se generó una primera mezcla que incluía Random Primers (3  $\mu$ g/ $\mu$ l), dNTP mix (10 mM), RNA (entre 500 y 1500 ng) y agua DEPC. Dicha mezcla se mantuvo a 65°C por 5 minutos y posteriormente se incubó en hielo durante 1 minuto.

Transcurrido este tiempo se agregó una segunda mezcla que contenía buffer de reacción, DTT 0.1 M y RNasa (40 U/ $\mu$ l). Esta nueva mezcla se mantuvo a 37°C por 2 minutos, y enseguida se adicionó la enzima M-MLV reverso transcriptasa, para finalmente realizar la transcripción reversa utilizando los siguientes parámetros: 25°C (10 minutos), 37°C (50 minutos) y 70°C (15 minutos). El cDNA obtenido se almacenó a 4°C, hasta que se tenía suficiente número de muestras para realizar los análisis de PCR.

#### 6c) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR anidado.

Una vez obtenido el cDNA, éste se amplificó mediante PCR para evaluar la expresión de Abl (como control interno) y de Bcr-Abl. En ambos casos se utilizó la enzima Taq DNA Polimerasa, y los primers respectivos dependiendo de la molécula a analizar, siguiendo el siguiente procedimiento:

Se mezcló Buffer de PCR, MgCl<sub>2</sub> (50 mM), dNTPmix (10 mM), los primers respectivos (ver tabla 2), agua DEPC y la enzima Taq DNA Polimerasa (5 U/ $\mu$ l)

con 2 µl del cDNA obtenido previamente, para finalmente realizar la reacción de PCR utilizando los parámetros descritos en la **tabla 2**, dependiendo de la molécula que fue amplificada.

En el caso de la determinación de Bcr-Abl y con la finalidad de determinar de manera más confiable la presencia o ausencia de dicho transcrito se procedió a realizar un PCR anidado. Para ello, se utilizó la misma mezcla antes descrita, solo que se agregaron 2 µl del producto de PCR obtenido en la amplificación para BCR-ABL.

En todos los casos ARN extraído de la línea celular K562 (positiva para BCR-ABL), leucocitos de sangre periférica normal (obtenidos de donadores sanos), y agua tratada con DEPC, se usaron como controles positivo, negativo y de la reacción, respectivamente.

Molécula	Juegos de primers	Parámetros de amplificación
Abl	5'-CTTCTGGAAAGGGGTACCTATTA-3' 3'- GGAGTGTTTCTCCAGACTGTTG-5'	96°C-5min, (94°C-30seg, 60°C-1min, 72°C-1min) 35 ciclos y 72°C-10min.
Bcr-Abl (1ª reac.)	5'- GGAGTGTTTCTCCAGACTGTTG-3' 3'- GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA-5'	96°C-5min, (94°C-30seg, 61°C-1min, 72°C-1min) 35 ciclos y 72°C-10min
Bcr-Abl (anidado)	5'- TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT-3' 3'-GTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG-5'	96°C-5min, (94°C-30seg, 58°C-1min, 72°C-1min) 30 ciclos y 72°C-10min

**Tabla 2.** Juegos de primers y condiciones de amplificación utilizados de PCR y PCR-Anidado.

#### 6d) Detección de los productos.

Con la finalidad de determinar la presencia o ausencia de cada uno de los transcritos, 10 µl de los productos de cada reacción de PCR fueron cargados en un gel de agarosa al 1%, teñida con bromuro de etidio, y se detectó la presencia de una banda de 450 pb en el caso del transcrito de ABL, 510pb en el caso de BCR-ABL y 450 pb en el caso del transcrito de BCR-ABL obtenido después del PCR anidado.

## 6e) Controles positivos y negativos

La línea celular K562 fue utilizada como control positivo para los análisis de expresión de Bcr-Abl. Dicha línea es derivada de un paciente femenino de 53 años de edad con diagnóstico de LMC en crisis blástica, a quien se le tomo una biopsia de fluido pleural, a partir del cual se estableció la línea celular CML-1 o K562. Las células tenían morfología blastoide y por análisis cariotípico se determinó que presentan el cromosoma Ph, así como una translocación entre los brazos largos de los cromosomas 15 y 17. (Lozzio, 1975). Actualmente la línea celular es empleada como un modelo de diferenciación hematopoyética ya que es capaz de diferenciarse a los linajes eritroides, megacariocíticos y macrofágicos, dependiendo de las condiciones en las que sea cultivada (DiBacco, 2002).

Como controles negativos de expresión de Bcr-Abl se utilizaron células mononucleares, procedentes de sangre periférica movilizada (SPM) de donadores normales, que se encontraban en protocolos para trasplante alogénico.

## Estadística

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar del número de muestras indicadas. El análisis estadístico fue realizado mediante pruebas t de student y análisis de varianza de uno o dos factores utilizando el programa estadístico SPSS (version 10.0). La significancia estadística se asumió con valores de  $P < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

Con la finalidad de contribuir al conocimiento de la biología de la LMC tanto en la fase activa de la enfermedad, como durante la etapa de remisión, el objetivo de este proyecto fue caracterizar, en base a sus potenciales de proliferación y expansión, a dos subpoblaciones hematopoyéticas de la Médula Osea de pacientes con LMC: una subpoblación enriquecida en células progenitoras (CD34+LIN-) y la otra en células troncales (CD34+CD38-LIN-).

### 1. Caracterización de las células primitivas de Médula Ósea de pacientes con LMC antes de tratamiento.

#### 1.1. Caracterización de la subpoblación CD34+LIN-

Para iniciar con la caracterización de las diferentes subpoblaciones en LMC, fueron utilizadas 12 muestras de LMC en fase crónica que no habían recibido ningún tipo de tratamiento (virgen de tratamiento –LMC VT-), y se compararon con 5 muestras provenientes de Médula Osea Normal. Las diferentes muestras fueron sometidas a separación por gradiente de ficoll, para obtener la población de Células Mononucleares (CMN), y posteriormente enriquecerla en la subpoblación CD34+LIN-.

El enriquecimiento, se realizó utilizando columnas de selección negativa, en donde se eliminaron las células comprometidas hacia algún linaje de diferenciación. Este procedimiento consistió en la formación de un complejo tetramérico entre las células comprometidas hacia un linaje de diferenciación, reconocidas con anticuerpos específicos de linaje, a los cuales se unió un coloide magnético, mismo que favoreció su captura en una malla magnetica. De esta forma la fracción de células que permaneció adherida a la columna correspondía a

células positivas para algún linaje de diferenciación, mientras que la fracción que eluyó de la columna estaba enriquecida en la subpoblación CD34+LIN-.

Los resultados de la **Tabla 3**, indican que el número inicial de CMN como CD34+LIN- es superior en las muestras de LMC comparada con su contraparte normal, además de que el porcentaje de recuperación es mayor en LMC, ya que se obtiene el 8.1% del total de las CMN iniciales en LMC, comparadas con el 4.3% obtenido en MON.

Así mismo, al evaluar el contenido de células CD34+ mediante análisis de inmunocitoquímica se encontró, que tanto en CMN como en la subpoblación CD34+LIN- los números son muy similares ya que en la fracción de CMN se obtienen porcentajes de 2.1 y 2.3 para MON y LMC respectivamente, encontrando que estos últimos son muy semejantes a los reportados en la literatura, en donde se menciona que las células CD34+LIN- corresponden a un 2.5% del total de CMN (Szivassy y Hoffman, 1995). No obstante, en las células obtenidas después de la selección negativa, el porcentaje de células CD34 es de 58% en MON y 34% en LMC, lo que indica que aunque en ambos casos se está enriqueciendo la población, existen más células con características inmunofenotípicas de células progenitoras en la población proveniente de MON.

Una manera de verificar cuantas de las células CD34+ obtenidas son realmente células progenitoras hematopoyéticas y conociendo que su principal característica es formar colonias en cultivos semisólidos, se procedió a determinar el número de Células Formadora de Colonias (CFC). Para ello, una alícuota de CMN y células CD34+LIN- fueron cultivadas en metil-celulosa durante 14 días y al cabo de este tiempo, se determinó el enriquecimiento real de la población al evaluar el número de CFC de cada una de ellas (**Tabla 3**).

Los resultados indican que el contenido de CFC en la fracción de CMN es muy similar, ya que se detectan 676 y 695 CFC por cada 100,000 de MON y LMC respectivamente. No obstante, en la subpoblación CD34+LIN- de LMC se obtuvieron 7040 CFC por cada 100,000 células sembradas, lo que representa un enriquecimiento real de 12.1 veces, mientras que en MON, el número de CFC fue de 6209 por cada 100,000 células sembradas, para generar un enriquecimiento

real de 10.6 veces. Este dato demuestra que a pesar de que en MON existe mayor número de células positivas al antígeno CD34, no todas ellas son capaces de generar colonias *in-vitro*, por lo que las CFC en LMC y MON oscilan en los mismos niveles.

**Tabla 3.** Datos generales de la subpoblación CD34+LIN- de MON y LMC a día cero.

	<b>MON (n=5)</b>	<b>LMC (n=12)</b>
CMN (x10 <sup>6</sup> )	44.2 (± 13)	63 (± 30)
CD34 <sup>+</sup> LIN <sup>-</sup> (x10 <sup>3</sup> )	1849 (± 877)	4691* (± 3160)
% DE RECUPERACION	4.3 (± 1.4)	8.1* (± 6.4)
% DE CD34+ (CMN)	2.1 (± 0.7)	2.3 (± 1.5)
% DE CD34+ (CD34 <sup>+</sup> LIN <sup>-</sup> )	58 (± 19.7)	34* (± 11)
CFC / 100,000 (CMN)	676 (± 329)	695 (± 438)
CFC / 100,000 (CD34 <sup>+</sup> LIN <sup>-</sup> )	6209 (± 1840)	7040 (± 4902)
ENRIQUECIMIENTO (VECES)	10.6 (± 4.4)	12.1 (± 9.1)

Los datos representan el promedio ± desviación estándar de 5 muestras de MON y 12 muestras de LMC. Células Mononucleares (CMN) obtenidas por gradiente de ficoll, fueron enriquecidas en la subpoblación CD34+LIN- (CD34+LIN-). En ambas poblaciones se determinó el número de células positivas al antígeno CD34 (% de CD34+) y el número de Células Formadoras de Colonias por cada 100,000 células sembradas (CFC/100,000). El % de recuperación representa la cantidad de células que se obtuvieron después de la selección negativa, en relación con las CMN (consideradas el 100%) y el enriquecimiento indica las CFC obtenidas en la población CD34+LIN- dividido entre las CFC obtenidas en la población de CMN. (\*P < 0.05 con respecto a MON).

Cabe mencionar, que aunque en la fracción de CMN el número total de CFC obtenidas tanto en MON como LMC fue similar, hubo variaciones en el tipo de colonias que se generaron, ya que en LMC el 74.5% correspondía a progenitores de tipo eritroide, el 25% mieloides y el 0.5% mixtas, mientras que en MON existía un 61, 37 y 2% de colonias eritroides, mieloides y mixtas respectivamente (**Tabla 4**).

Sin embargo, las mayores diferencias se observaron en las CFC provenientes de la fracción celular enriquecida en la subpoblación CD34+LIN-, en donde se detectan 6209 CFC en las muestras provenientes de MON, de las cuales el 35% corresponden a colonias mieloides, el 63% a colonias eritroides y el 1.5% a colonias mixtas, mientras que en las muestras procedentes de LMC se detectan 7040 CFC de las cuales la mayoría corresponden a colonias de tipo eritroide con un 81%, las de tipo mieloides y mixtas se encuentran en un 18.5 y 0.5% respectivamente, lo que indica diferencias significativas en el tipo de colonias generadas en las muestras de LMC con respecto a MON. Este dato correlaciona con datos previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo en donde cultivos a largo plazo tratados con G-CSF, GM-CSF y EPO, inducen preferencialmente la diferenciación eritroide (Luna-Bautista et al, 2003); así como con lo reportado con Chalandon y colaboradores (2002), quienes mencionan que células CD34+LIN- de Sangre de Cordón Umbilical, al ser trasfectadas con el gen BCR-ABL, reducen el contenido de progenitores mieloides al tiempo que se favorece el número de progenitores del linaje eritroide.

**Tabla 4.** Porcentaje de CFC mieloides, eritroides y mixtas en CMN y CD34+LIN- de MON y LMC al inicio de los cultivos.

	MON (n=5)		LMC (n=12)	
	CMN	CD34 <sup>+</sup> LIN <sup>-</sup>	CMN	CD34 <sup>+</sup> LIN <sup>-</sup>
MIELOIDE (%)	37 (± 5)	35.5 (± 3)	25 (± 19)	18.5* (± 13)
ERITROIDE (%)	61 (± 6)	63 (± 4)	74.5 (± 29)	81* (± 14)
MIXTA (%)	2 (± 0)	1.5 (± 0.5)	0.5 (± 0.1)	0.5 (± 0.3)

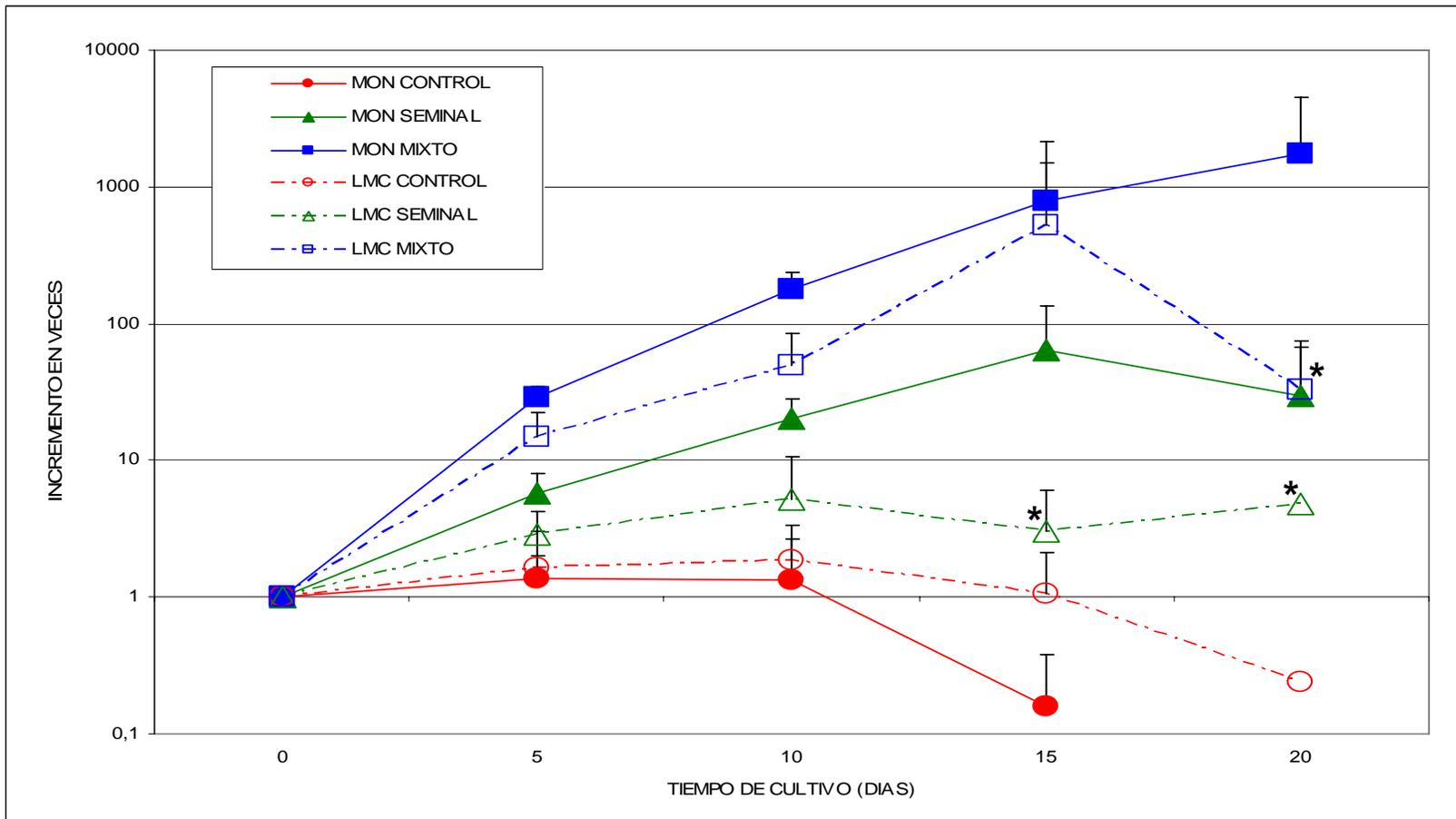
Los datos representan el promedio ± desviación estándar del porcentaje de las diferentes CFC evaluadas después de 14 días en cultivos semisólidos. (\*P < 0.05 con respecto a MON).

Una vez conocidas las características generales de la población, y con la finalidad de determinar la capacidad de proliferación de las células CD34+LIN- en

respuesta a citocinas, las poblaciones enriquecidas procedentes de LMC y MON fueron cultivadas en tres diferentes condiciones de cultivo.

La primera, denominada condición control, consistió en medio de expansión sin ningún tipo de citocina adicional. La segunda, denominada condición seminal consistió en medio de expansión suplementado con Interleucina 6 (IL-6) 10 ng/ml, Trombopoyetina (Tpo) 10 ng/ml, Factor de Células Seminales (SCF) 10 ng/ml, y Ligando de Flt3 (Flt3-L) 10 ng/ml, dichas citocinas por si solas se involucran en el mantenimiento y la supervivencia de las células seminales y progenitoras hematopoyéticas, aunque en combinación son capaces de tener efectos sinérgicos e inducir proliferación celular. La tercera condición de cultivo, denominada mixta incluyó citocinas que además de regular mantenimiento y supervivencia de las células [Interleucina 6 (IL-6) 10 ng/ml, Trombopoyetina (Tpo) 10 ng/ml, Factor de Células Seminales (SCF) 10 ng/ml, y Ligando de Flt3 (Flt3-L) 10 ng/ml], también fue capaz de inducir la proliferación de células comprometidas hacia el linaje mieloide [Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF) 20 ng/ml, y Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monolitos (GM-CSF) 10 ng/ml], el linaje eritroide, [Eritropoyetina (Epo) 15 UI/ml], o bien hacia ambos linajes hematopoyéticos [Interleucina 3 (IL-3) 10 ng/ml].

Las células fueron cultivadas en las diferentes condiciones de cultivo, realizando su respectivo cambio de medio cada 5 días, tiempo en el cual se cuantificó el número celular obtenido, y dicho número se extrapolo al número celular obtenido en el cambio de medio inmediato anterior, de manera que se calculó el incremento acumulado (cultivo delta) de la población celular total a los diferentes días de cultivo (**Figura 6**).



**Figura 6. Proliferación de células CD34+LIN- de MON y LMC en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas.** Los resultados indican la media  $\pm$  desviación estándar de células de MON (n= 5) y LMC (n=12) que fueron cultivadas en medio de expansión libre de citocinas (MON CONTROL y LMC CONTROL respectivamente), en presencia de una combinación seminal (MON SEMINAL y LMC SEMINAL), o una combinación mixta (MON MIXTO Y LMC MIXTO). A los diferentes cultivos se les realizó un cambio de medio cada 5 días y el incremento celular en veces se calculó al extrapolar el número existente en cada día de cultivo con el número celular contado en el cambio de medio inmediato anterior. Los cultivos fueron mantenidos mientras había células en las diferentes combinaciones de citocinas. (\*P < 0.05 con respecto a MON)

Como lo muestran los resultados, las células sembradas en la condición control no fueron capaces de incrementar sus números celulares ya que la población de MON desaparece a los 10 días de cultivo, mientras que su contraparte de LMC permanece por 15 días presentando un ligero incremento (1.8 veces en el día 10) en su capacidad de proliferación. Este resultado sugiere que las células CD34+LIN- de LMC son menos dependientes de citocinas que su contraparte normal, probablemente debido a que son capaces de producir algunas de las citocinas que ellas mismas necesitan. A este respecto, reportes previos han mostrado que células CD34+Ph+ de LMC que se encuentran en un estado proliferante activo, poseen un mecanismo autócrino de regulación de la proliferación en el que se involucran la IL-3 y el G-CSF, lo que les confiere una ventaja de proliferación en relación con las células Ph- que se encuentran en estado quiescente (Holyoake et al, 2001). Así mismo, Janowska-Wieczorec y colaboradores (2002), al transfectar la línea celular FL5.12 con el gen Bcr-Abl, encontraron que las células son capaces de secretar al medio VEGF, FGF-2 HGF, e IL-8, lo que les permite estimular su proliferación y angiogénesis.

Por otro lado, cuando las células fueron cultivadas en presencia de la combinación seminal, se detecta que ambas poblaciones son capaces de responder al estímulo con citocinas. Sin embargo, las células de MON tienen significativamente mayor capacidad de proliferar que las células de LMC, ya que las primeras obtienen su máximo de proliferación (64.2 veces) en el día 15, lo que no sucede en el caso de las células de LMC donde el mayor incremento de proliferación se alcanza a día 10 con 5.2 veces.

En el caso de las células cultivadas en la combinación mixta, se detectó que la proliferación fue significativamente mayor en el caso de MON, donde el máximo incremento se registra al día 20 de cultivo con 1753 veces, mientras que para LMC fue de 520 veces en el día 15.

Los resultados anteriores indican que las células CD34+LIN- de LMC tienen deficiencias en su capacidad de proliferación aún en presencia de diferentes combinaciones de citocinas, y esta deficiencia es mas evidente si se comparan los máximos incrementos registrados entre las células de LMC (520 veces en la

combinación mixta a día 15) con el de las células de MON (1753 veces en la combinación mixta a día 20), observando que la proliferación en LMC corresponde al 30% de la proliferación detectada en MON.

A este respecto, se ha descrito que debido a la presencia de Bcr-Abl, las células de LMC presentan alterados los mecanismos de proliferación y muerte celular, lo que conduce a una excesiva tasa de proliferación *in vivo* (Cortez et al, 1997; Jonuleit et al, 1998). Sin embargo, el detectar que *in vitro* las células de LMC tienen menos capacidad de proliferar que las células de MON sugiere las siguientes posibilidades:

- 1) Que el microambiente hematopoyético leucémico juegue un papel importante en el estímulo proliferativo *in-vivo*, hecho que puede asociarse con eventos de adhesión, ya que se sabe que la interacción de las células troncales al estroma celular a través de integrinas y fibronectina, altera directamente la conducta proliferativa de los progenitores hematopoyéticos normales. Sin embargo, en el caso de progenitores leucémicos la alteración en la expresión de integrinas asociado a la expresión de BCR-ABL, puede ser la causa de la excesiva proliferación *in-vivo*, tal y como lo han sugerido Verfaillie y colaboradores (1997).
- 2) Que las células leucémicas *in vivo* secreten alguna citocina que contribuya a incrementar su capacidad de proliferación. Este evento podría relacionarse con el trabajo de Eisterer, et al (2005), quien al trasplantar LT-CIC de pacientes con LMC en ratones inmunodeficientes, encontró que se producen células CD34+ capaces de autorregularse mediante la producción de IL-3 y GM-CSF, tal y como se había descrito que sucedía *in vitro*. Así mismo Sillaber et al (2004), ha demostrado que en el suero de pacientes con LMC existen niveles incrementados de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), e incluso lo ha propuesto como una molécula asociada al desarrollo de la enfermedad.
- 3) Que la combinación y concentración de citocinas empleada en este trabajo no sea suficiente para igualar la proliferación detectada *in vivo*. Este punto está directamente relacionado con el punto anterior, aunque además debe aclararse que nuestro sistema *in-vitro* carece de todos los mecanismos (presencia de

estroma, matriz extracelular, gradientes de citocinas y factores de crecimiento, etc) que podrían favorecer de forma sinérgica y/o aditiva la proliferación *in-vivo*.

4) Que se produzca algún factor *in-vitro*, que inhiba la proliferación de las células leucémicas, y que esta producción de inhibidores sea consecuencia del estímulo dado en el cultivo, por ejemplo que el hecho de estimular con GM-CSF, favorezca la producción de  $TNF\alpha$  y este a su vez inhiba la proliferación de las células leucémicas.

Aunado a lo anterior, es importante mencionar que reportes en la literatura indican que el uso de 100 ng/ml de SCF induce la proliferación de células CD34+ de LMC, mientras que no estimula la proliferación de la misma subpoblación proveniente de MON, lo que provoca la acumulación de la clona leucémica aunque a largo plazo también podría favorecer la desaparición de células Ph+ y la permanencia en cultivo de la población residual normal (Moore et al, 1998). En este mismo sentido, se sabe que la IL-3 y el GM-CSF estimulan la proliferación de células CD34+ de LMC a concentraciones menores de 10 U/ml, ya que al llegar a esta concentración o incrementarla, el efecto se invierte y se torna inhibidor de la proliferación (Bedi et al, 1994).

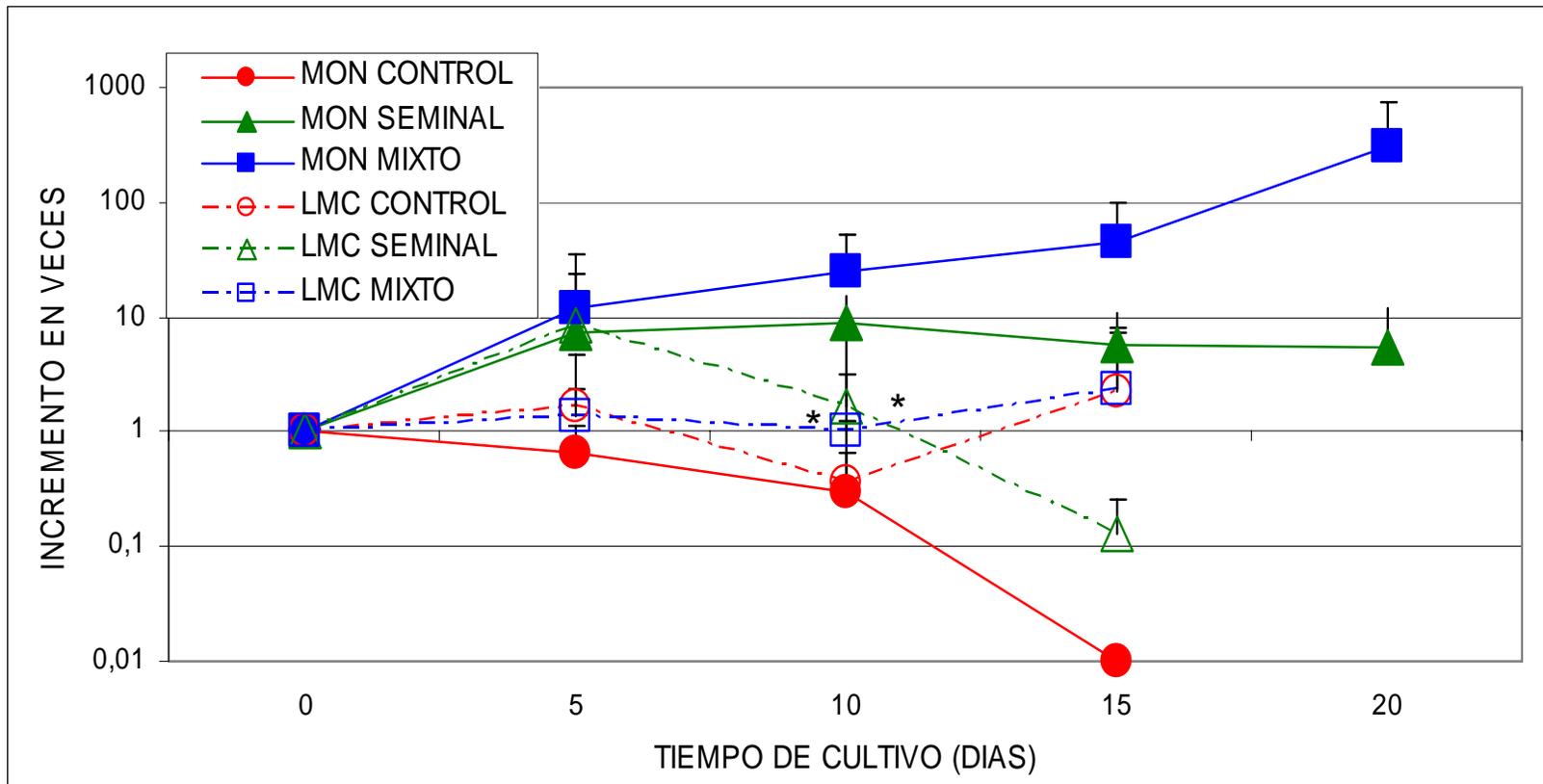
Bajo estas observaciones, nuestros resultados confirman lo aportado en la literatura, donde se indica que la concentración y la combinación de factores de crecimiento son críticos para determinar qué tanto los progenitores normales o de LMC predominan *in vitro* e *in vivo*, y qué tanto su respuesta proliferativa se relaciona o no con expansión celular (Bhatia et al, 2000; Bedi et al, 1994).

Por otra parte, durante los diferentes cambios de medio y en cada una de las condiciones de cultivo, se tomó una pequeña alícuota celular y se determinó la presencia de CFC en metil-celulosa. Después de 14 días, se evaluaron las colonias generadas y el número detectado se extrapolo con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, para calcular el incremento en veces en relación con el número de CFC determinado en el día cero de cultivo. Este dato permitió conocer si la población celular obtenida en una determinada condición y día de cultivo, era capaz de generar células con características de células progenitoras

(capaces de formar colonias), semejantes a las que les dieron origen en cultivo, evento que se conoce como expansión celular.

La **Figura 7** demuestra que las células de LMC provenientes de las combinaciones control y mixta a los diferentes días y condiciones de cultivo, tienen nula o limitada capacidad de expansión. Sin embargo, en células leucémicas provenientes de la combinación seminal, se observa una expansión de 8.5 veces en los primeros 5 días de cultivo, efecto que ya no es detectado en los días subsiguientes. El hecho de no detectar expansión en los cultivos provenientes de la combinación mixta, correlacionan con lo reportado por Bhatia y colaboradores (2000), quienes mencionan que las células progenitoras de LMC al ser estimuladas con factores de crecimiento tienen una reducción en su capacidad de formar colonias, debido a que incrementan aceleradamente su proliferación celular.

No obstante, al comparar esta capacidad formadora de colonias con la misma subpoblación proveniente de MON, se puede observar que tanto en la combinación seminal como en la combinación mixta, existe capacidad de expansión, detectándose más colonias en las células provenientes de la combinación mixta. Es importante resaltar que en la combinación seminal se observa un efecto claro de la combinación de citocinas empleadas, ya que como antes se mencionó, favorecen la autorrenovación y supervivencia de las células, quienes logran mantener un nivel constante de CFC hasta por 20 días de cultivo. Cabe hacer notar que en todos los casos la expansión en MON es significativamente mayor que la detectada en LMC. Sin embargo, hay reportes que indican que el potencial de las células progenitoras de LMC no está alterado y que se comportan como células normales (Kabarowsky y Witte, 2000) o incluso se ha llegado a sugerir que la sola expresión de Bcr-Abl es suficiente para incrementar el número total de CFC y particularmente los de linaje mielóide de forma dosis dependiente. Dicho incremento, es reversible al eliminar la expresión del gen quimérico, por lo que se ha sugerido que Bcr-Abl además de estimular la proliferación, es capaz de cambiar el patrón de diferenciación hematopoyética (Era y Witte, 2000).



**Figura 7. Expansión de células CD34+LIN- de MON y LMC en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas.** Una alícuota de las células sembradas en las diferentes combinaciones de cultivo fue sembrada en medio semisólido para evaluar el número de CFC. Las colonias detectadas después de 14 días, fueron extrapoladas con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, y el incremento en veces se calculó en relación con el número de CFC determinado en el día cero. Células de MON (n=5) y LMC (n=12) provenientes de cultivos en medio de expansión libre de citocinas (MON CONTROL y LMC CONTROL respectivamente), células provenientes de la combinación seminal (MON SEMINAL y LMC SEMINAL), células provenientes de la combinación mixta (MON MIXTO y LMC MIXTO). (\*P<0.05 con respecto a MON)

Un aspecto altamente controvertido en la expansión de células provenientes de LMC es el tipo de colonias que se generan, ya que hay autores que mencionan que la mayoría de las colonias detectadas pertenecen al linaje mielóide en proporción 4:1 con respecto al eritroide (Era y Witte, 2000), mientras que autores como Chalandon y colaboradores, (2002), mencionan que la presencia de Bcr-Abl en estas células, modula la diferenciación hacia el linaje eritroide.

En este sentido, los resultados de la **Tabla 5**, demuestran que en el caso de las células de LMC cultivadas en ausencia de citocinas, así como en las dos diferentes combinaciones de citocinas, existe un mayor porcentaje de células del linaje eritroide en el día 5 de cultivo, el cual disminuye a lo largo del tiempo. No obstante, en el caso de MON, existe a lo largo de todo el tiempo de cultivo un porcentaje semejante de CFC de los linajes mieloides y eritroides, aunque existe una moderada tendencia a formar colonias eritroides en los últimos días de los cultivos.

**Tabla 5.** Porcentaje de CFC mieloides, eritroides y mixtas en células CD34+LIN- de MON y LMC a diferentes días y condiciones de cultivo.

		CONTROL			SEMINAL			MIXTA		
		Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix
<b>Día</b> <b>5</b>	<b>MON</b>	52 (± 2)	44 (± 3)	4 (± 0.2)	43 (± 2)	56 (± 4)	1 (± 0.1)	35 (± 3)	65 (± 2)	0 (± 0)
	<b>LMC</b>	29* (± 3)	71* (± 3)	0 (±0.1)	32 (± 3)	68* (± 3)	0 (± 0.1)	32 (± 2)	68 (± 4)	0 (± 0)
<b>Día</b> <b>10</b>	<b>MON</b>	67 (± 4)	33 (± 2)	0 (± 0)	54 (± 3)	44 (± 2)	2 (± 0.2)	61 (± 4)	39 (± 2)	0 (± 0)
	<b>LMC</b>	nd	nd	nd	64 (± 2)	36 (± 4)	0 (± 0.1)	36* (± 2)	64* (± 3)	0 (± 0)
<b>Día</b> <b>15</b>	<b>MON</b>	98 (± 4)	2 (± 0.5)	0 (± 0)	69 (± 3)	30 (± 2)	1 (± 0.1)	73 (± 2)	27 (± 1)	0 (± 0)
	<b>LMC</b>	nd	nd	nd	94* (± 2)	6* (± 1)	0 (± 0.1)	79 (± 3)	21 (± 4)	0 (± 0)

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de las diferentes CFC evaluadas después de 14 días en cultivos semisólidos. Las células provenían de cultivos líquidos en la condición control libre de citocinas (CONTROL), de la combinación seminal (SEMINAL) y de la combinación mixta (MIXTA), a los días 5, 10 y 15 de cultivo. nd, indica que no se determino por falta de células (\*P < 0.05 con respecto a MON)

Estos hallazgos, aunados a las deficiencias detectadas en las cinéticas de proliferación y expansión (mencionadas en las **Figuras 5 y 6**), evidencian que las células CD34+LIN- de LMC tienen alteraciones numéricas y funcionales, con respecto a la misma subpoblación proveniente de MON.

## 1.2 Caracterización de la subpoblación CD34+CD38-LIN-

Diversos reportes en la literatura han descrito que el origen de la LMC es una CTH muy primitiva que presenta el rearreglo Bcr-Abl y que tiene la capacidad de inducir un comportamiento leucémico al trasplantarse en ratones inmunodeficientes (Witte, 2001; Holyoake et al, 1999). Sin embargo, el inmunofenotipo de la subpoblación en la que se origina este padecimiento así como las características biológicas de subpoblaciones enriquecidas en células troncales altamente primitivas no está claramente descrito. Es por ello que con la finalidad de contribuir a entender el origen y comportamiento de células troncales en LMC, se procedió a caracterizar una subpoblación celular más primitiva que la anteriormente descrita.

Para ello, 12 muestras de LMC en fase crónica sin tratamiento previo y 5 muestras de MON fueron enriquecidas en células CD34+CD38-LIN-. Dicho enriquecimiento se realizó de forma semejante al de la subpoblación CD34+LIN-, solo que la combinación de anticuerpos incluía anti-CD38, anti-CD36 y anti-CD45RA, con los cuales se eliminaron progenitores mieloides, monocíticos, T y B, mas primitivos.

Los resultados obtenidos (**Tabla 6**), indican que las células procedentes de LMC tienen números incrementados de CMN así como de células CD34+CD38-LIN- en comparación con su contraparte normal. Dichas diferencias se hacen más evidentes en el porcentaje de recuperación, ya que mientras la MON se encuentra dentro del rango normal recuperando el 0.15%, el porcentaje de recuperación en LMC es de 0.53%, lo que indica que la subpoblación CD34+CD38-LIN- se encuentra incrementada 3.5 veces. Este dato sugiere que desde etapas muy primitivas de la hematopoyesis leucémica se detectan alteraciones, y aunque este incremento en la población no había sido descrito en la literatura, apoya la teoría que indica que es en una subpoblación altamente primitiva en donde puede iniciarse la transformación leucémica (Todisco et al, 2000).

**Tabla 6.** Datos generales de la subpoblación CD34+CD38-LIN- de MON y LMC a día cero.

	<b>MON (n=5)</b>	<b>LMC (n=12)</b>
CMN ( $\times 10^6$ )	45.3 ( $\pm 35$ )	116 ( $\pm 41$ )
CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> LIN <sup>-</sup> ( $\times 10^3$ )	99 ( $\pm 79$ )	574 ( $\pm 676$ )
% DE RECUPERACION	0.15 ( $\pm 0.1$ )	0.53*( $\pm 0.39$ )
% DE CD34+ (CMN)	2.1 ( $\pm 0.7$ )	2.3 ( $\pm 1.5$ )
% DE CD34+ (CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> LIN <sup>-</sup> )	70 ( $\pm 25$ )	77.1 ( $\pm 27.9$ )
CFC / 100,000 (CMN)	676 ( $\pm 329$ )	695 ( $\pm 438$ )
CFC / 100,000 (CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> LIN <sup>-</sup> )	8971 ( $\pm 6015$ )	2509 ( $\pm 1600$ )
ENRIQUECIMIENTO (VECES)	16.2 ( $\pm 11.6$ )	16( $\pm 25.7$ )

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 muestras de MON y 12 muestras de LMC. Células Mononucleares (CMN) obtenidas por gradiente de ficoll, fueron enriquecidas en la subpoblación CD34+CD38-LIN- (CD34+CD38-LIN-). En ambas poblaciones se determinó el número de células positivas al antígeno CD34 (% de CD34+) y el número de Células Formadoras de Colonias por cada 100,000 células sembradas (CFC/100,000). El % de recuperación representa la cantidad de células que se obtuvieron después de la selección negativa, en relación con las CMN (consideradas el 100%) y el enriquecimiento indica las CFC obtenidas en la población CD34+LIN- dividido entre las CFC obtenidas en la población de CMN. (\*P < 0.05 con respecto a MON).

Cabe mencionar que del 0.53% de células recuperadas en LMC, el 77% de ellas presentaron el antígeno CD34, de manera similar a lo que sucedió en MON, donde se detecta que el 70% del 0.15% de células recuperadas son células CD34. Sin embargo, al evaluar funcionalmente las células CD34 mediante análisis de CFC, se detectó que las células leucémicas no son capaces de generar colonias con la misma eficiencia que las células de MON, ya que se registraron 2509 y 8971 CFC respectivamente. Cabe hacer notar, que a pesar de la diferencia en las colonias generadas, el enriquecimiento en ambas subpoblaciones es prácticamente el mismo.

Así mismo, al evaluar el tipo de CFC presentes en CMN y células CD34+CD38-LIN- de MON y LMC recién obtenidas (**Tabla 7**), se encontró que existen diferencias significativas en la subpoblación CD34+CD38-LIN-, donde mientras para LMC existe un mayor número de CFC eritroides (70%), las muestras de MON presentan una mayoría de colonias (58%) del linaje mieloide. Esta observación, vuelve a poner de manifiesto que los datos encontrados en este trabajo correlacionan con el trabajo de Chalandon y colaboradores (2002), aunque sigue quedando como interrogante, el por que *in vivo* el linaje que se ve favorecido es el mieloide a expensas del eritroide.

**Tabla 7.** Porcentaje de CFC mieloides, eritroides y mixtas en CMN y CD34+CD38-LIN- de MON y LMC al inicio de los cultivos

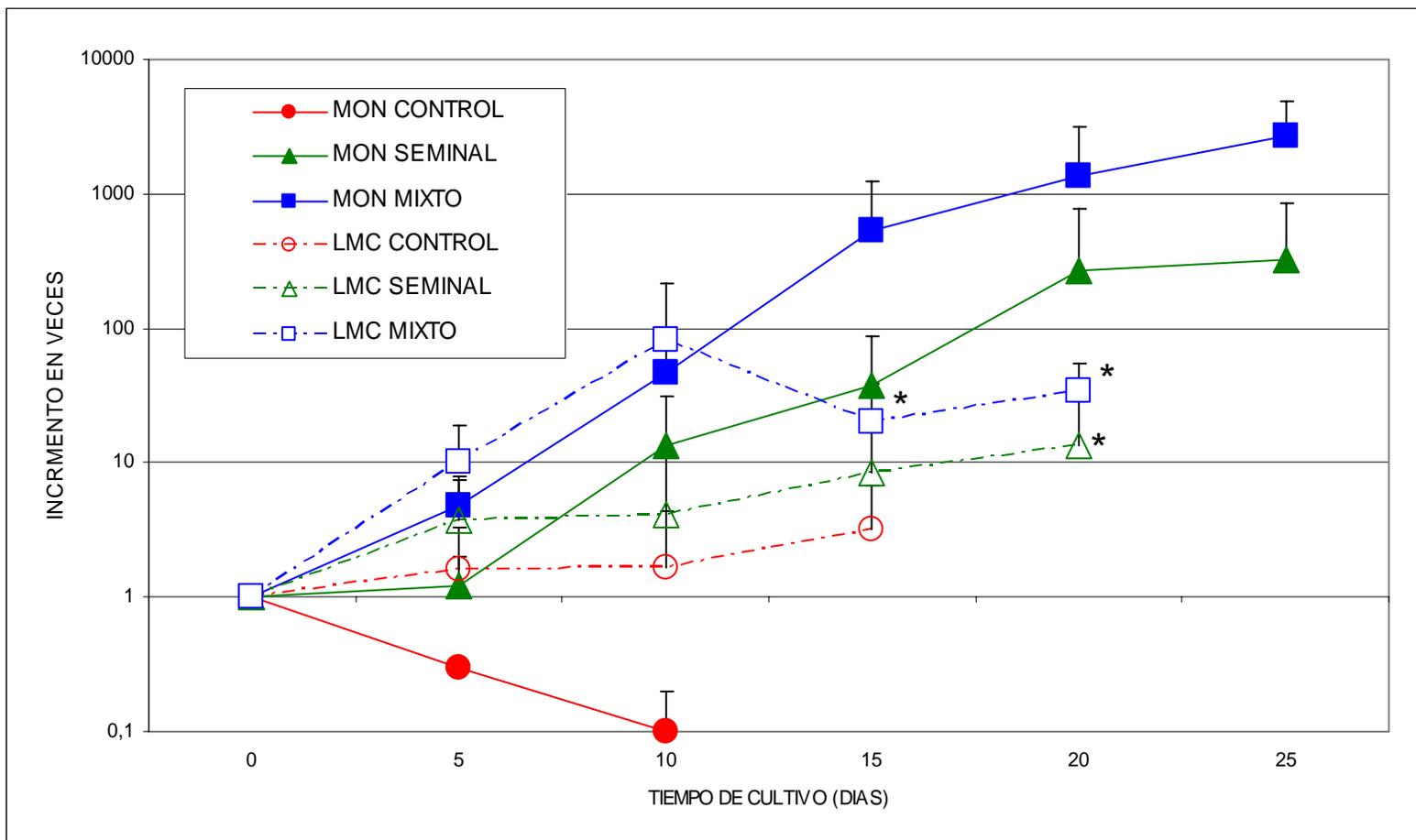
	MON (n=5)		LMC (n=12)	
	CMN	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> LIN <sup>-</sup>	CMN	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> LIN <sup>-</sup>
MIELOIDE	37 (± 5)	58 (± 29)	25 (± 19)	30 (± 20)
ERITROIDE	61 (± 6)	41 (± 28)	74.5 (± 29)	70* (± 21)
MIXTA	2 (± 0)	1 (± 0.5)	0.5 (± 0.1)	nd

Los datos representan el promedio ± desviación estándar del porcentaje de las diferentes CFC evaluadas después de 14 días en cultivos semisólidos. (\*P < 0.05 con respecto a MON).

Por otra parte, al analizar la capacidad de proliferación de la subpoblación CD34+CD38-LIN- (**Figura 8**), se encontró que las células de MON al ser cultivadas en ausencia de citocinas desaparecen rápidamente del cultivo, mientras que las de LMC permanecen en cultivo hasta 15 días, en donde se detecta un incremento de 3.2 veces. Estos resultados una vez mas se asocian con reportes en la literatura, en donde diferentes grupos de investigación mencionan que las células primitivas de LMC producen y secretan factores de crecimiento involucrados en la proliferación, el bloqueo de apoptosis, la migración y la angiogénesis (Holyoake et al, 2002; Holyoake et al, 2001; Janowska-Wieczorek et al, 2002).

En lo referente a las células cultivadas en presencia de citocinas, se observa que las células de MON permanecen hasta 25 días y alcanzan un incremento de 322 veces en la combinación seminal y de 2664 veces en la combinación mixta. Sin embargo, las células procedentes de LMC, presentan limitada capacidad de proliferar en respuesta a las mismas combinaciones de citocinas, ya que solo permanecen en cultivo por 20 días, tiempo en el que alcanzan sus valores máximos de proliferación de 13 y 34 veces para las combinaciones seminal y mixta respectivamente.

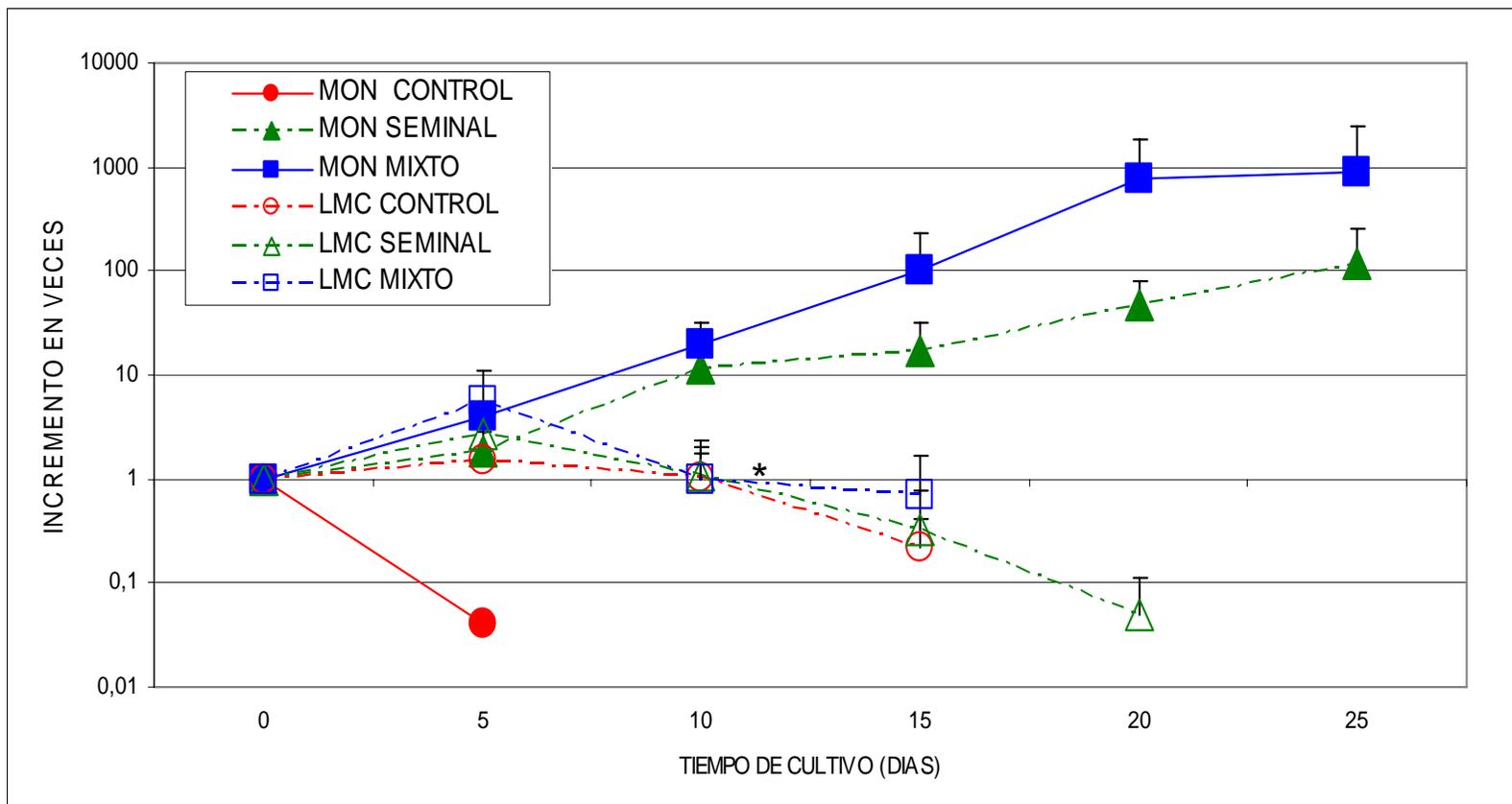
Estos datos son relevantes, ya que podría esperarse que en una población hematopoyética mas primitiva el número celular generado sea mayor, hecho que se observa al comparar los incrementos máximos de la subpoblación CD34+CD38-LIN- con la subpoblación CD34+LIN- de MON. Sin embargo, al comparar el máximo incremento observado en las células CD34+CD38-LIN- de LMC (64 veces en la combinación mixta a día 10) con el máximo incremento en la misma subpoblación de MON (2547 veces en la combinación mixta a día 25), se detecta que la proliferación en LMC corresponde al 2.5% de la proliferación detectada en MON. Este dato hace evidente que la subpoblación mas primitiva de LMC es la que posee las mayores deficiencias en su capacidad de proliferación, aunque reportes en la literatura indican que células CD34+CD38- provenientes de sangre de pacientes con LMC, al ser cultivadas con 100ng/ml de Flt-3L y 20ng/ml de SCF, IL-3, IL-6 y G-CSF son capaces de incrementar sus números celulares después de 10 días en cultivo (Petzer et al, 1997), e incluso encontrarse en las fases S/G2M del ciclo celular (Kramer et al, 2001). En este mismo sentido, Udomsakdi y otros (1992), mencionarán que LTC-IC provenientes de pacientes con LMC, se encuentran en estado proliferativo y activado, lo que incluso contrasta con el mismo tipo celular proveniente de MON, el cual se encuentra en estado quiescente. Cabe mencionar que aunque en ambas publicaciones se trabaja con células muy primitivas, las poblaciones celulares son diferentes a las empleadas en este trabajo, además que en uno de ellos se emplearon altas concentraciones de citocinas en relación con lo que se utilizó en este trabajo, lo que podría explicar su incremento en la proliferación.



**Figura 8. Proliferación de células CD34+CD38-LIN- de MON y LMC en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas.** Células de MON (n=5) y LMC (n=12) fueron cultivadas en medio de expansión libre de citocinas (MON CONTROL y LMC CONTROL respectivamente), en presencia de una combinación seminal (MON SEMINAL y LMC SEMINAL), o una combinación mixta (MON MIXTO Y LMC MIXTO). A los diferentes cultivos se les realizó un cambio de medio cada 5 días y el incremento celular en veces se calculó al extrapolar el número existente en cada día de cultivo con el número celular contado en el cambio de medio inmediato anterior. Los cultivos fueron mantenidos mientras había células en las diferentes condiciones. (\*P<0.05 con respecto a MON)

En lo referente a la capacidad de expansión, la **Figura 9** muestra que la subpoblación CD34+CD38-LIN- de LMC no es capaz de generar CFC después de haber sido cultivada en cualquiera de las combinaciones de citocinas, lo que reafirma que es en esta subpoblación leucémica en donde se presentan las mayores alteraciones, y apoya lo descrito por Petzer y colaboradores (1997), quienes mencionan que células seminales de LMC están caracterizadas por una disminuida capacidad de autorrenovación, lo que implica expansión.

Sin embargo, para el caso de MON las células comienzan a expandirse después de 10 días de cultivo en las combinaciones seminal y mixta, presentando incrementos de 120 y 893 veces respectivamente. Esta expansión tardía en las células de MON puede deberse a que una vez que se recibió el estímulo inicial de proliferación y para este momento del cultivo, las células que inicialmente pertenecían a la subpoblación CD34+CD38-LIN-, hubieran continuado con su proceso de maduración y ahora formen parte de la subpoblación CD34+LIN-, la cual se caracteriza por poseer mayor capacidad de formar colonias.



**Figura 9. Expansión de células CD34+CD38-LIN- de MON y LMC en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas.** Una alícuota de las células sembradas en las diferentes combinaciones de cultivo fue sembrada en medio semisólido para evaluar el número de CFC. Las colonias detectadas después de 14 días, fueron extrapoladas con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, y el incremento en veces se calculó en relación con el número de CFC determinado en el día cero. Células de MON (n=5) y LMC (n=12) provenientes de cultivos en medio de expansión libre de citocinas (MON CONTROL y LMC CONTROL respectivamente), células provenientes de la combinación seminal (MON SEMINAL y LMC SEMINAL), células provenientes de la combinación mixta (MON MIXTO Y LMC MIXTO). (\*P<0.05 con respecto a MON)

Cabe mencionar que el tipo de CFC generadas en MON y LMC son también diferentes, ya que mientras en MON a los diferentes días y condiciones de cultivo se detectan colonias tanto mieloides como eritroides (aunque el mayor porcentaje corresponde al linaje mieloide), la mayoría de las colonias detectadas en las células procedentes de los cultivos control en LMC son del linaje eritroide, mientras que en las otras dos combinaciones se detectan CFC mieloides y eritroides (**Tabla 8**).

Si consideramos que las muestras de LMC utilizadas en este trabajo son positivas para Bcr-Abl, podemos inferir que las subpoblaciones CD34+LIN- y CD34+CD38-LIN- también lo son. Por ello en los primeros días de cultivo, las células presentan más CFC eritroides, pero conforme el tiempo de cultivo avanza y las poblaciones responden a la proliferación, es probable que las células Bcr-Abl+ desaparezcan, y que solo permanezcan en el cultivo las células Philadelphia negativas, que podrían ser las responsables de la presencia de CFC mieloides en los últimos días de cultivo. En este sentido Couloumbel y colaboradores (1983), demostraron que en cultivos a largo plazo tipo Dexter la población residual normal presente en LMC permanece después de 6 semanas en cultivo, mientras que la población leucémica desaparece conforme éste avanza.

En este sentido, la detección de una combinación de citocinas apropiada para estimular la expansión de la población Ph- sería de suma importancia, ya que permitiría encontrar un sistema de purga biológica en el que se podría recuperar la población residual normal.

**Tabla 8.** Porcentaje de CFC mieloides, eritroides y mixtas en células CD34+CD38-LIN- de MON y LMC a diferentes días y condiciones de cultivo.

		CONTROL			SEMINAL			MIXTAS		
		Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix
Día 5	MON	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
	LMC	27.6 (±4)	69.3 (± 16)	0.1 (± 0)	33 (± 13)	66.3 (± 12)	0.7 (± 0.2)	35.8 (± 13)	64.2 (± 17)	0
Día 10	MON	nd	nd	nd	65 (± 9)	35 (± 16)	0	58 (± 4)	42 (± 6)	0
	LMC	50.2 (± 6)	49.8 (± 9)	0	60.2 (± 15)	39.8 (± 15)	0	41 (± 12)	59 (± 23)	0
Día 15	MON	nd	nd	nd	44 (± 4)	56 (± 9)	0	53 (± 4)	47 (± 6)	0
	LMC	69 (± 13)	31 (± 11)		63.2 (± 16)	36.8 (± 17)	0	62 (± 13)	38 (± 17)	0

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de las diferentes CFC evaluadas después de 14 días en cultivos semisólidos. Las células provenían de cultivos líquidos en la condición control libre de citocinas (CONTROL), de la combinación seminal (SEMINAL) y de la combinación mixta (MIXTA), a los días 5, 10 y 15 de cultivo. nd, indica que no se determino por falta de células. No existen diferencias significativas con relación a la MON.

### 1.3 Caracterización de las subpoblaciones CD34+LIN- y CD34+CD38-LIN- en respuesta a TNF $\alpha$ .

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), es una citocina que afecta un amplio rango de actividades en diferentes tipos celulares, siendo su principal efecto la inhibición de la proliferación, motivo por el cual se ha usado ampliamente en el control de diferentes neoplasias como agente antitumoral. Sin embargo, sus efectos tóxicos debido a la administración sistémica han limitado su aplicación clínica, por lo que en la mayoría de los casos es usado en combinación con otros agentes.

En el caso particular de la hematopoyesis, se conoce que el TNF $\alpha$  es capaz de inhibir la proliferación de células progenitoras multipotentes de medula ósea, así como de disminuir el número de células formadoras de colonias eritroides aún en presencia de citocinas. Sin embargo, también se ha descrito que es capaz de inducir la proliferación de células CD34+ y progenitores granulocito-macrófago, si se encuentra a bajas concentraciones y combinado con GM-CSF o IL-3, lo que sugiere que tiene un efecto bidireccional en la regulación de la hematopoyesis (Rusten y Jacobsen, 1995; Hu et al, 1999, Caux et al, 1990).

Aunado a lo anterior, se sabe que esta citocina ha sido empleada en pacientes con LMC positivos a Bcr-Abl y resistentes al tratamiento con IFN $\alpha$ , lo que ha mostrado una eficacia clínica, aunque no una remisión citogenética (Wandi et al, 1992; Moritz et al, 1992). A pesar de lo anterior, el efecto de esta molécula en las actividades de proliferación y expansión de subpoblaciones de células troncales y progenitoras hematopoyéticas no ha sido evaluado.

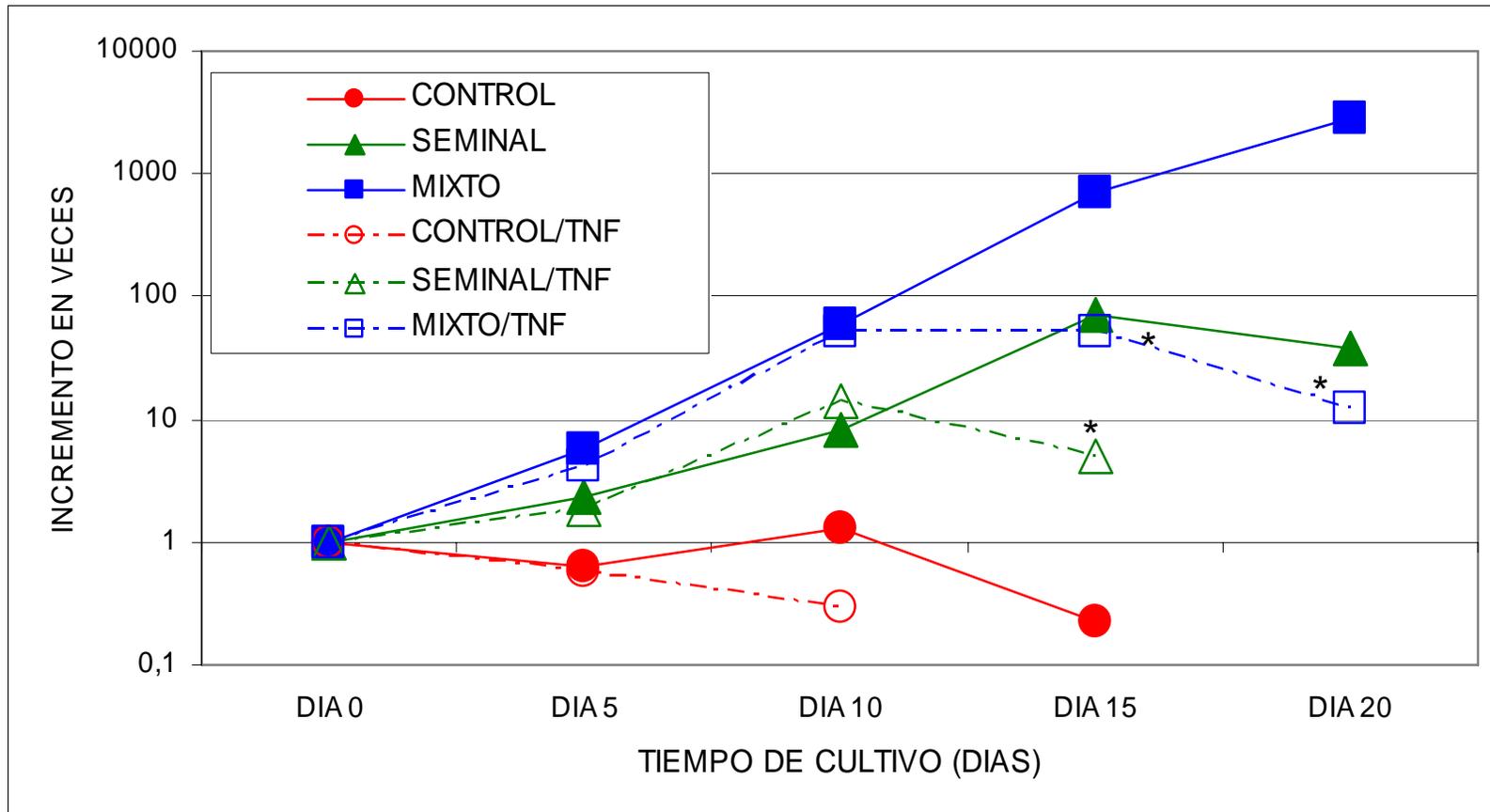
Por esta razón, 5 muestras de MON y 12 muestras de LMC fueron enriquecidas en la población de células progenitoras CD34+LIN-, mediante selección inmunomagnética negativa, y una vez obtenidas, las células fueron cultivadas en las combinaciones de citocinas antes descritas más 10 ng/ml de TNF $\alpha$  para evaluar el efecto de este factor en la capacidad proliferativa y de expansión de dichas células.

La **Figura 10** demuestra que las células seminales de MON, cultivadas en presencia de TNF $\alpha$  disminuyen significativamente su proliferación en relación con

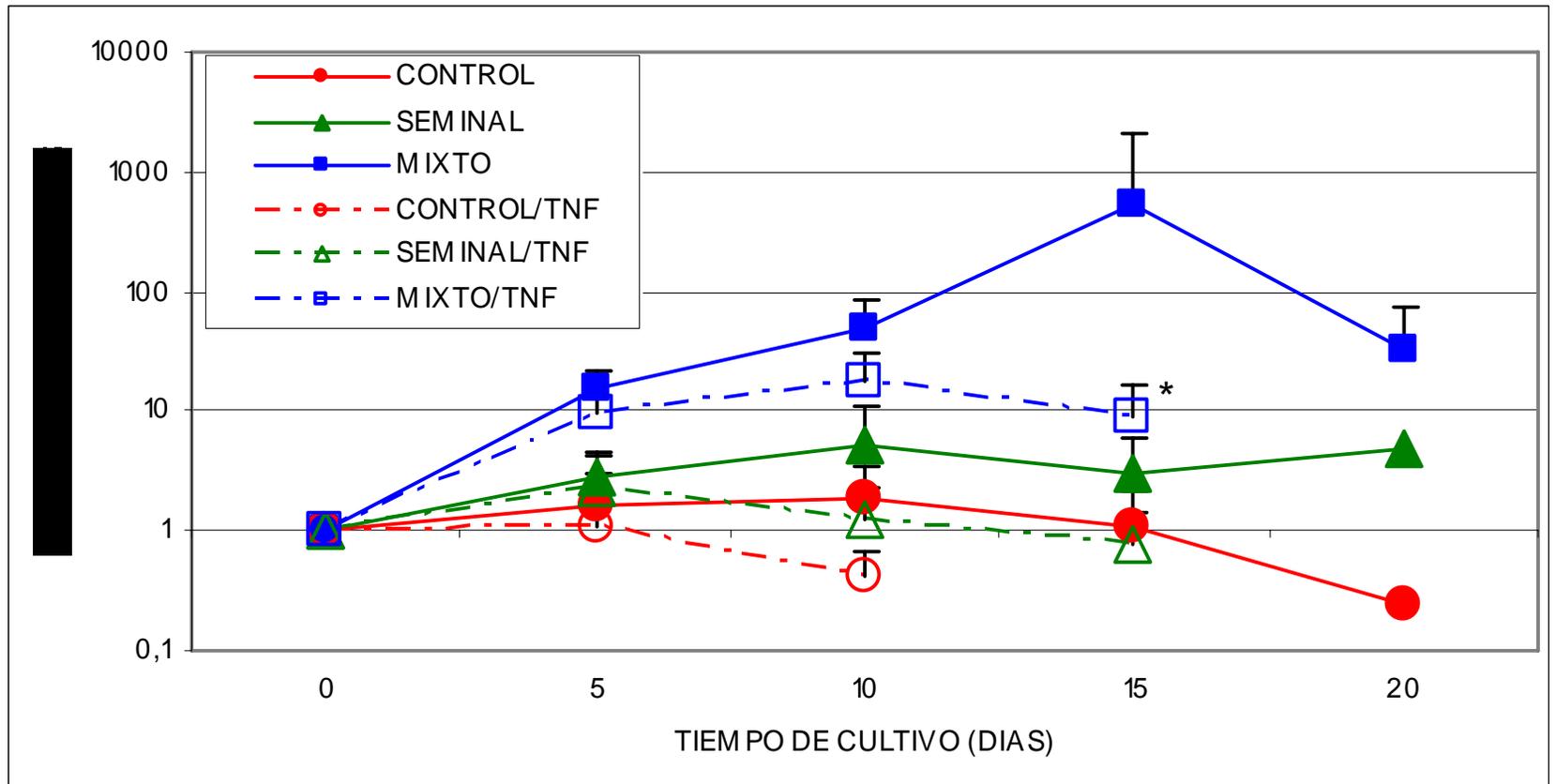
las mismas células cultivadas en ausencia de esta citocina. Este hecho se pudo observar cuando se utilizó la combinación seminal, en donde la proliferación se reduce 14 veces (de 71 a 5 veces en el día 15); así como cuando se utilizó la combinación mixta, en donde se detectó una reducción de 224 veces en el día 20 (de 2778 a 12.4). Estos datos correlacionan con lo reportado por Rusten y colaboradores (1994), quienes reportaron que el  $TNF\alpha$  puede inhibir la proliferación de células  $CD34+$  de MON, aún después de haber sido estimuladas con SCF, GM-CSF e IL-3, efecto que en su trabajo se asoció con la disminución de la expresión en superficie del receptor c-kit.

En cuanto a las células  $CD34+LIN-$  de LMC, también se observó inhibición de la proliferación en respuesta al estímulo con  $TNF\alpha$  (**Figura 11**), ya que en la combinación seminal se detectó una reducción de 4.3 veces (de 5.2 a 1.2 en el día 10) en relación con las células cultivadas en ausencia del inhibidor. De igual forma en la combinación mixta a día 15 la proliferación disminuyó de 520 a 8.7 veces en presencia de  $TNF\alpha$ , lo que representa una reducción de 59.7 veces. Este resultado demuestra que aunque las células de LMC son capaces de responder al efecto inhibitor inducido por  $TNF\alpha$ , también muestran cierto grado de resistencia, ya que nunca igualan el efecto de inhibición de la proliferación detectado en MON, en donde incluso llegó a ser de 224 veces.

En relación a este punto Jonuleit y otros (1998), demostraron que células  $CD34+$  de LMC tienen afectada la distribución en las fases del ciclo celular y en consecuencia su proliferación, en relación con células  $CD34+$  de MON. No obstante, este autor encuentra que las células de LMC y MON son capaces de secretar la misma concentración de IL-1a, IL-6 e incluso el mismo  $TNF\alpha$ . Este último punto correlaciona con el trabajo de Duncombe y colaboradores (1989), quienes encontraron que las células progenitoras de LMC en fase crónica, expresan constitutivamente el ARNm de  $TNF\alpha$  y secretan la proteína activa, hecho que lo llevo a proponer que, la presencia de esta citocina contribuye a mantener de forma estable la fase crónica de la LMC en donde actúa como su regulador negativo autócrino.



**Figura 10. Proliferación de células CD34+lin- de MON, en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas en presencia o ausencia de TNF $\alpha$ .** Células de MON (n=5) fueron cultivadas en medio de expansión libre de citocinas (CONTROL), medio de expansión en presencia de una combinación seminal (SEMINAL), medio de expansión mas la combinación de citocinas mixta (MIXTO), medio de expansión en las diferentes combinaciones de citocinas mas TNF $\alpha$  (CONTROL/TNF; SEMINAL/TNF; MIXTO/TNF). A los diferentes cultivos se les realizó un cambio de medio cada 5 días y el incremento celular en veces se calculó al extrapolar el número existente en cada día de cultivo con el número celular contado en el cambio de medio inmediato anterior. Los cultivos fueron mantenidos mientras había células en las diferentes condiciones. (\*P<0.05 con respecto a la misma condición de cultivo sin TNF)



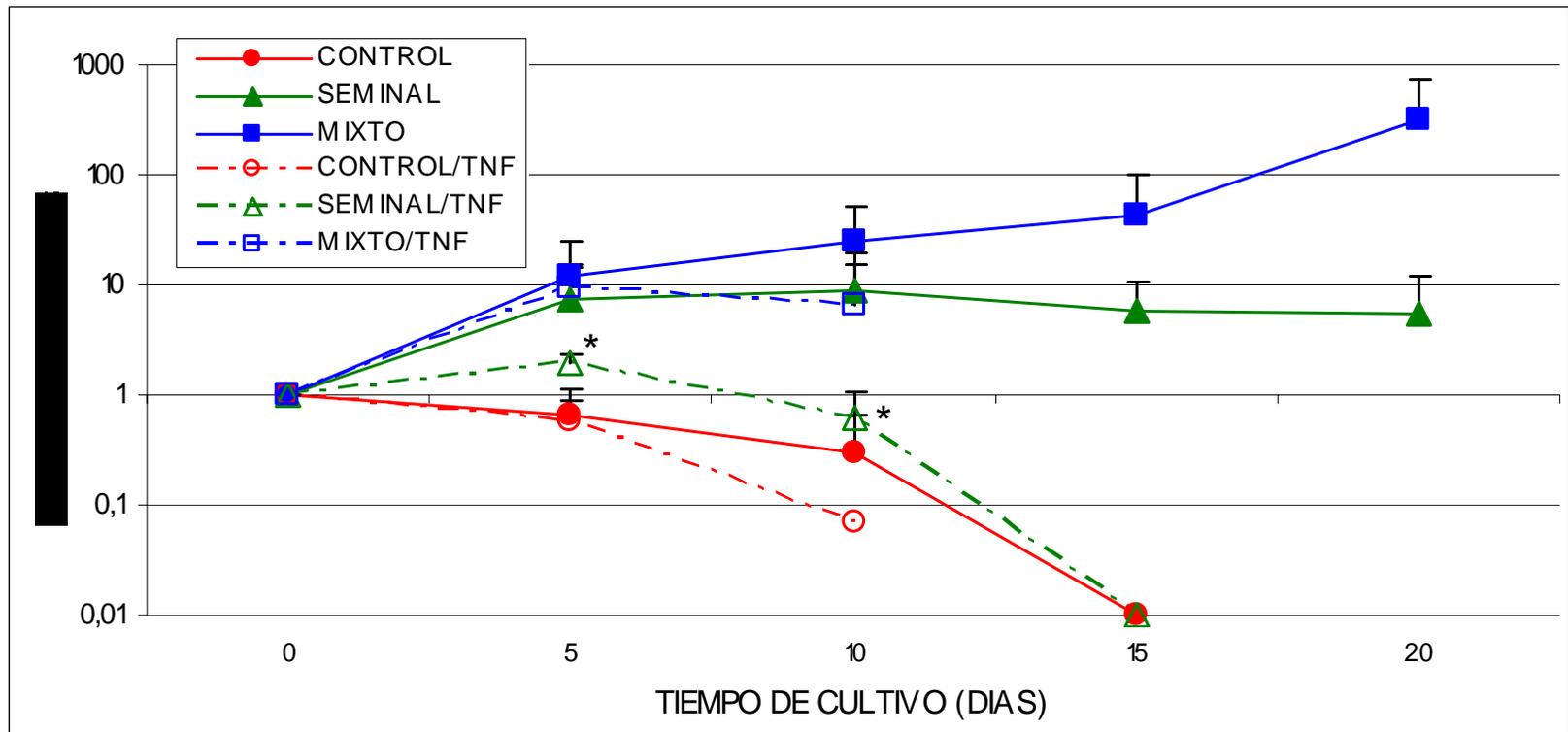
**Figura 11. Proliferación de células CD34+LIN- de LMC en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas en presencia o ausencia de TNF $\alpha$ .** Células de LMC (n=12) fueron cultivadas en medio de expansión libre de citocinas (CONTROL), medio de expansión en presencia de una combinación seminal (SEMINAL), medio de expansión mas la combinación de citocinas mixta (MIXTO), medio de expansión en las diferentes combinaciones de citocinas mas TNF $\alpha$  (CONTROL/TNF; SEMINAL/TNF; MIXTO/TNF). A los diferentes cultivos se les realizó un cambio de medio cada 5 días y el incremento celular en veces se calculo al extrapolar el número existente en cada día de cultivo con el número celular contado en el cambio de medio inmediato anterior. Los cultivos fueron mantenidos mientras había células en las diferentes condiciones. (\*P<0.05 con respecto la misma condición de cultivo sin TNF)

En lo referente a la expansión (**Figura 12**), se observó que cuando las células de MON fueron tratadas con  $\text{TNF}\alpha$  su capacidad de formar colonias disminuye drásticamente, ya que no se detectaron CFC cuando las células provenían de los cultivos control y seminal. No obstante, las células que procedían de la combinación mixta en presencia de  $\text{TNF}\alpha$  muestran una limitada capacidad de expandirse, debido a que solo se detectan colonias durante los 10 primeros días de cultivo, con un máximo de 9.2 veces a día 5, lo que no sucede en el caso de las células cultivadas en la combinación mixta sin  $\text{TNF}\alpha$ , en donde existe una expansión de hasta 313.5 veces en el día 20 de cultivo.

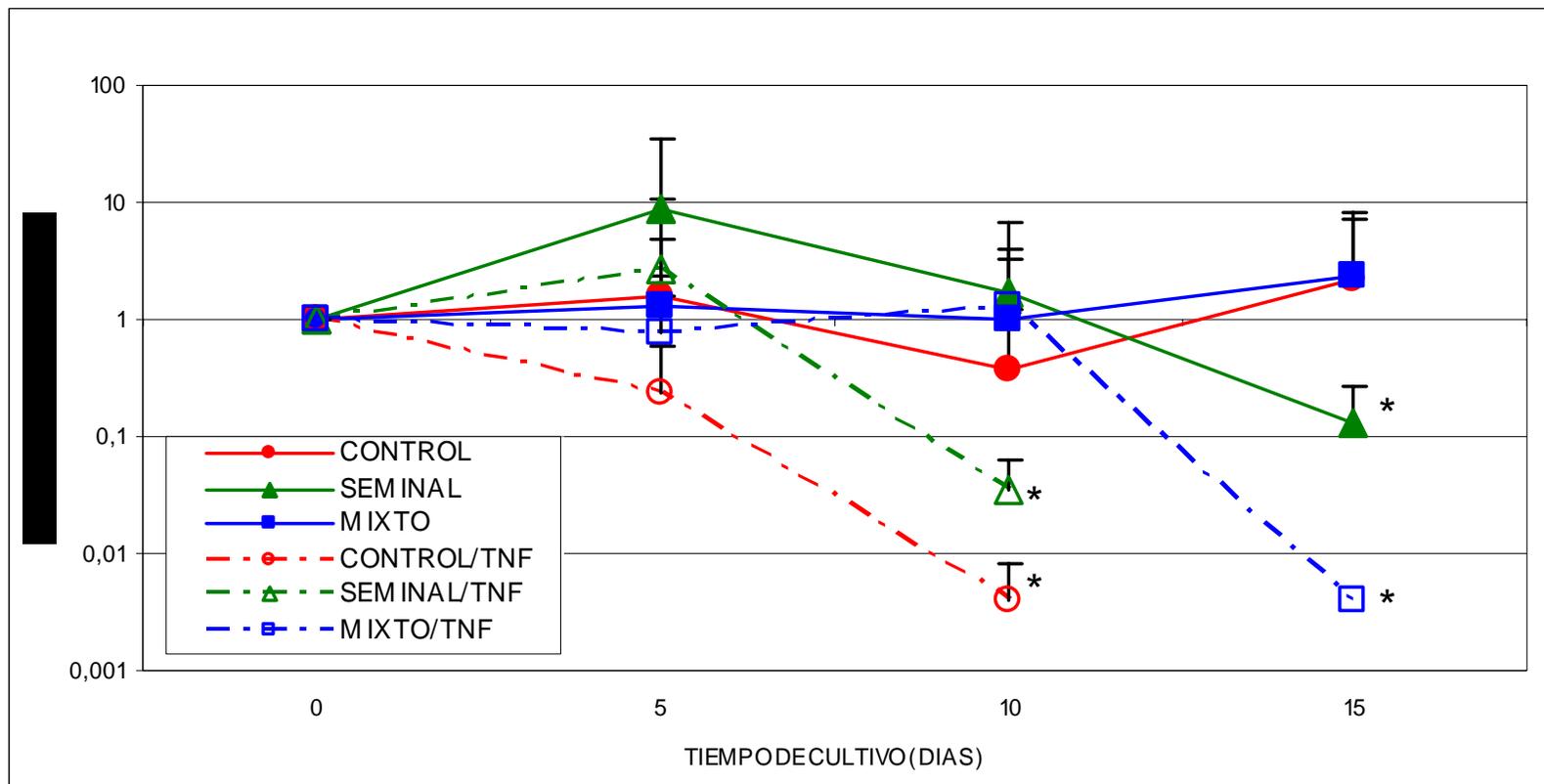
Este efecto inhibitorio de la expansión también es detectado en las células  $\text{CD34}^+\text{LIN}^-$  de LMC tratadas con  $\text{TNF}\alpha$  (**Figura 13**), en donde se observa que no existe capacidad de formar colonias en las células cultivadas en las combinaciones control y mixta, mientras que en las células cultivadas en la combinación seminal la expansión se reduce de 8.5 a 2.6 veces en ausencia y presencia de  $\text{TNF}\alpha$  respectivamente, lo que muestra su efecto inhibitorio de la expansión.

Cabe mencionar que en los cultivos de MON tratados con  $\text{TNF}\alpha$  las pocas colonias que se cuantificaron pertenecían predominantemente al linaje eritroide (**Tabla 9**), aunque en cultivos libres de  $\text{TNF}\alpha$  (ver tabla 5), las colonias que se detectaron pertenecían a los linajes eritroide y mieloide, siendo incluso mayor el linaje mieloide en los últimos días de cultivo. Este dato indica entonces que el  $\text{TNF}\alpha$  inhibe preferentemente el linaje mieloide en células provenientes de MON, lo que correlaciona con lo reportado con Beran y otros (1988), ya que mencionan que el  $\text{TNF}\alpha$  inhibe el crecimiento clonogénico de progenitores granulocito-macrófago, cuando se encuentra presente de forma continua en el medio de cultivo. Sin embargo, al mismo tiempo se contraponen por lo descrito por Rusten y Jacobsen (1995), quienes encuentran que el  $\text{TNF}\alpha$  inhibe la eritropoyesis humana. Cabe aclarar que esta diferencia puede estar dada por la concentración de  $\text{TNF}\alpha$  usada, la combinación de citocinas en que se aplicó el  $\text{TNF}\alpha$ , o más aún

por el tipo de células empleadas, ya que en el trabajo de Rusten se utilizan células CD34+, cultivadas en presencia de IL-3 (100 ng/ml), SCF y Epo (200 ng/ml) mas 2 ng/ml de  $TNF\alpha$ .



**Figura 12. Expansión de células CD34+ LIN- de MON en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas en presencia o ausencia de TNF $\alpha$ .** Una alícuota de las células sembradas en las diferentes combinaciones de cultivo en presencia y ausencia de TNF $\alpha$  fueron sembradas en medio semisólido para evaluar el número de CFC. Las colonias detectadas después de 14 días, fueron extrapoladas con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, y el incremento en veces se calculó en relación con el número de CFC determinado en el día cero. Células de MON provenientes de cultivos en medio de expansión libre de citocinas en presencia y ausencia de TNF $\alpha$  (CONTROL y CONTROL/TNF respectivamente), células provenientes de la combinación seminal en ausencia y presencia de TNF $\alpha$  (SEMINAL y SEMINAL/TNF), células provenientes de la combinación mixta en ausencia y presencia de TNF $\alpha$  (MIXTO Y MIXTO/TNF). (\*P<0.05 con respecto a la misma condición de cultivo sin TNF)



**Figura 13. Expansión de células CD34+LIN- de LMC en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas en presencia o ausencia de TNF $\alpha$ .** Una alícuota de las células sembradas en las diferentes combinaciones de cultivo en presencia y ausencia de TNF $\alpha$  fueron cultivadas en medio semisólido para evaluar el número de CFC. Las colonias detectadas después de 14 días, fueron extrapoladas con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, y el incremento en veces se calculó en relación con el número de CFC determinado en el día cero. Células de MON provenientes de cultivos en medio de expansión libre de citocinas en presencia y ausencia de TNF $\alpha$  (CONTROL y CONTROL/TNF respectivamente), células provenientes de la combinación seminal en ausencia y presencia de TNF $\alpha$  (SEMINAL y SEMINAL/TNF), células provenientes de la combinación mixta en ausencia y presencia de TNF $\alpha$  (MIXTO Y MIXTO/TNF). (\*P<0.05 con respecto a la misma condición de cultivo sin TNF)

En cuanto a la LMC, se observó que existen colonias tanto del linaje mieloide como eritroide (**Tabla 9**), contrario a lo que sucede en las CFC que se generaron en los cultivos libres de  $TNF\alpha$  (ver tabla 5) en donde las colonias son preferencialmente eritroides. Estos datos podrían sugerir que el  $TNF\alpha$  inhibe a los progenitores Bcr-Abl positivos que, como antes se mencionó provocan la generación de colonias eritroides, y permitiría dar una explicación del por que ésta molécula cuando es usada como opción terapéutica en combinación con  $IFN\alpha$ , provoca una disminución de la población leucémica (Wandi et al, 1992). Así mismo los datos indican que la población de células progenitoras hematopoyéticas  $CD34+LIN-$  de LMC, además de responder de forma alterada a la estimulación con citocinas, también presentan alteraciones en los mecanismos de respuesta al inhibidor de la proliferación  $TNF\alpha$ .

**Tabla 9.** Porcentaje de CFC mieloides, eritroides y mixtas en células CD34+LIN- de MON y LMC a diferentes días y condiciones de cultivo mas TNF $\alpha$ .

		CONTROL			SEMINAL			MIXTA		
		Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix
Día 5	MON	16	82	2	25	75	0	19	81	0
	TNF	( $\pm 3$ )	( $\pm 7$ )	( $\pm 0.6$ )	( $\pm 4$ )	( $\pm 8$ )		( $\pm 5$ )	( $\pm 11$ )	
	LMC	35*	65*	0	37	67	0	40	60	0
	TNF	( $\pm 2$ )	( $\pm 3$ )		( $\pm 7$ )	( $\pm 9$ )		( $\pm 7$ )	( $\pm 8$ )	
Día 10	MON	86	10	4	39	61	0	36	84	0
	TNF	( $\pm 8$ )	( $\pm 2$ )	( $\pm 3$ )	( $\pm 7$ )	( $\pm 4$ )		( $\pm 4$ )	( $\pm 9$ )	
	LMC	56*	54*	0	55	45	0	42	58*	0
	TNF	( $\pm 11$ )	( $\pm 9$ )		( $\pm 5$ )	( $\pm 2$ )		( $\pm 8$ )	( $\pm 6$ )	
Día 15	MON	nd	nd	nd	61	39	0	nd	nd	nd
	TNF				( $\pm 3$ )	( $\pm 4$ )				
	LMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	100	0	0
	TNF							( $\pm 2$ )		

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de las diferentes CFC evaluadas después de 14 días en cultivos semisólidos. Las células provenían de cultivos líquidos en la condición control libre de citocinas (CONTROL), de la combinación seminal (SEMINAL) y de la combinación mixta (MIXTA), a los días 5, 10 y 15 de cultivo en presencia de TNF $\alpha$ . nd, indica que no se determinó por falta de células (\*P < 0.05 con respecto a MON).

Los datos anteriores sugirieron que las mismas alteraciones detectadas en la subpoblación de células progenitoras hematopoyéticas CD34+LIN-, también podían estar presentes en la subpoblación celular más primitiva CD34+CD38-LIN- por lo que se procedió con su caracterización en respuesta a la misma citocina.

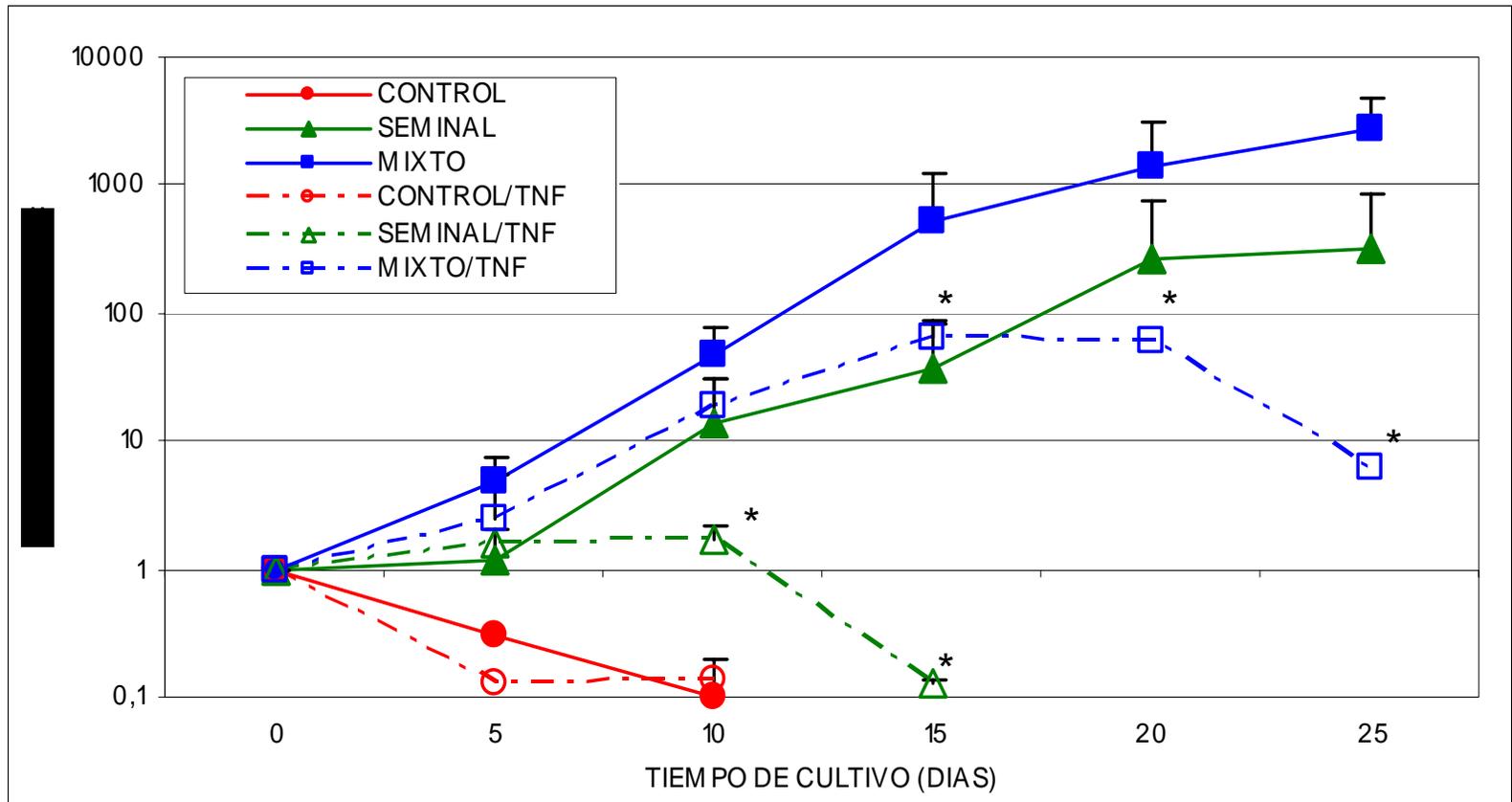
Para ello, 12 muestras provenientes de LMC en fase crónica y virgen de tratamiento, así como 3 muestras de MON, fueron enriquecidas en la subpoblación de células seminales CD34+CD38-LIN-, y sembradas en las combinaciones de citocinas antes descritas, para evaluar sus potenciales de proliferación y expansión.

En relación con la proliferación, se encontró que las células seminales de MON no son capaces de proliferar cuando se cultivan en las combinaciones control y seminal en presencia de TNF $\alpha$  (**Figura 14**), mientras que cuando son cultivadas en la combinación mixta más TNF $\alpha$ , obtienen un máximo de proliferación de 65 veces en el día 15, lo que demuestra que su proliferación es inferior a la detectada en la misma combinación de citocinas sin el inhibidor, en donde el máximo de proliferación es de 2264 veces en el día 25, lo que implica una reducción en la proliferación de 34.8 veces.

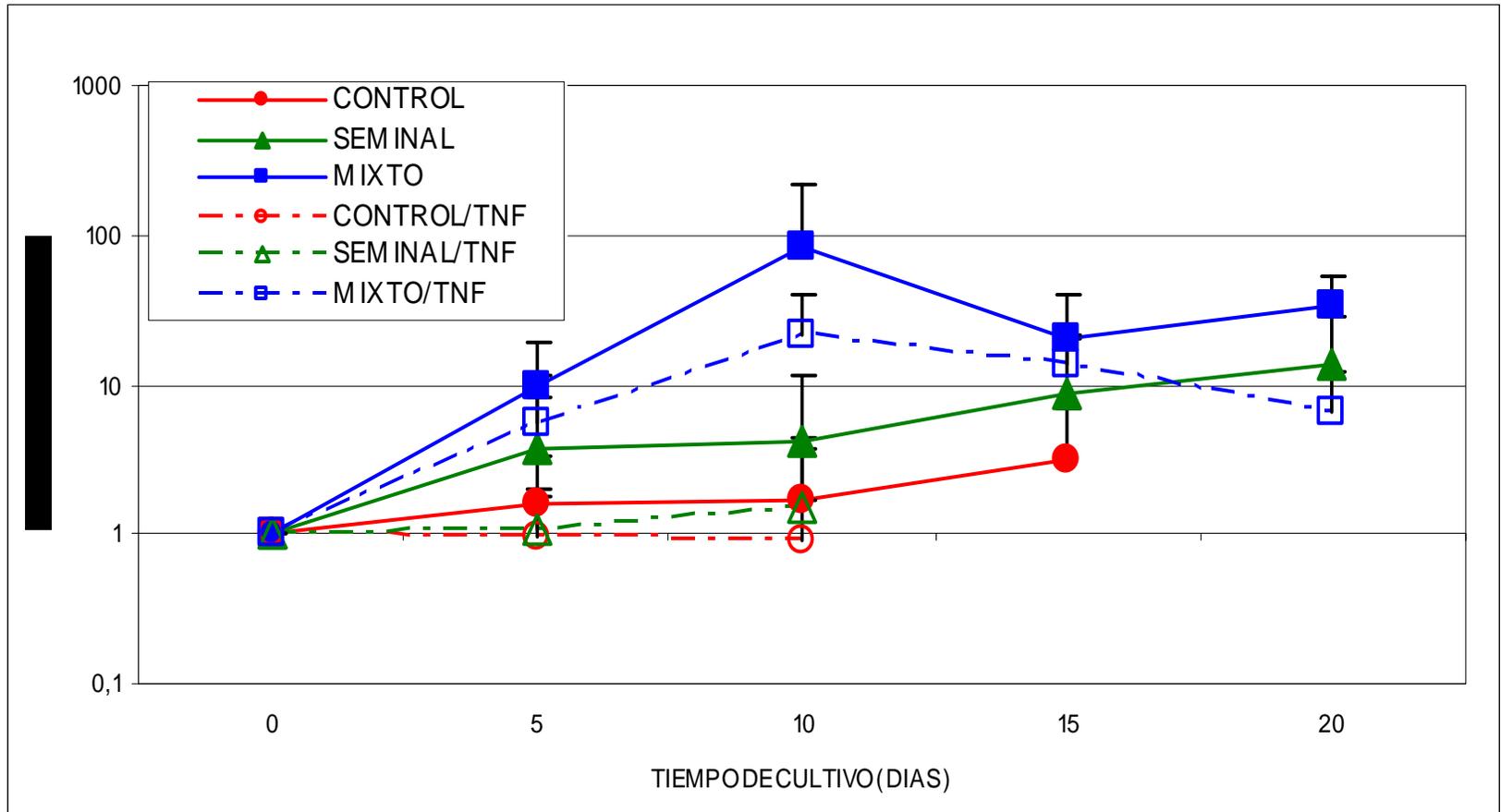
En lo referente a la proliferación de las células CD34+CD38-LIN- de LMC en presencia o ausencia de TNF $\alpha$  (**Figura 15**), se encontró que de forma semejante a lo que sucede en MON, las células cultivadas en la condición control y seminal, fueron incapaces de proliferar cuando había TNF $\alpha$  en el medio de cultivo, lo que no sucedió cuando el TNF $\alpha$  estaba presente en la combinación mixta, ya que las células tuvieron una moderada respuesta a la proliferación (21.3 veces en el día 10), aunque nuevamente ésta fue menor a la detectada en las células que se cultivaron en ausencia de TNF $\alpha$ , que proliferaron 82 veces en el mismo día de cultivo.

Cabe mencionar que si se compara la disminución de la proliferación entre las subpoblaciones de células troncales (224 veces) y progenitoras (34.8 veces) provenientes de MON y cultivadas en la combinación de citocinas mixta, se

observó que el  $\text{TNF}\alpha$  inhibe en mayor grado la proliferación de las células hematopoyéticas más primitivas, lo que concuerda con datos reportados por Ramsfjell y colaboradores (1997), quienes encuentran que los progenitores hematopoyéticos  $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$  cultivados en presencia de TPO o en la combinación de TPO, FLT3-L y SCF, son completamente abatidos en su proliferación por efecto del  $\text{TNF}\alpha$ .



**Figura 14. Proliferación de células CD34+CD38-LIN- de MON en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas en presencia o ausencia de TNF $\alpha$ .** Células de MON (n=3) fueron cultivadas en medio de expansión libre de citocinas (CONTROL), medio de expansión en presencia de una combinación seminal (SEMINAL), medio de expansión mas la combinación de citocinas mixta (MIXTO), medio de expansión en las diferentes combinaciones de citocinas mas TNF $\alpha$  (CONTROL/TNF; SEMINAL/TNF; MIXTO/TNF). A los diferentes cultivos se les realizó un cambio de medio cada 5 días y el incremento celular en veces se calculó al extrapolar el número existente en cada día de cultivo con el número celular contado en el cambio de medio inmediato anterior. Los cultivos fueron mantenidos mientras había células en las diferentes condiciones. (\*P<0.05 con respecto a la misma condición de cultivo sin TNF).

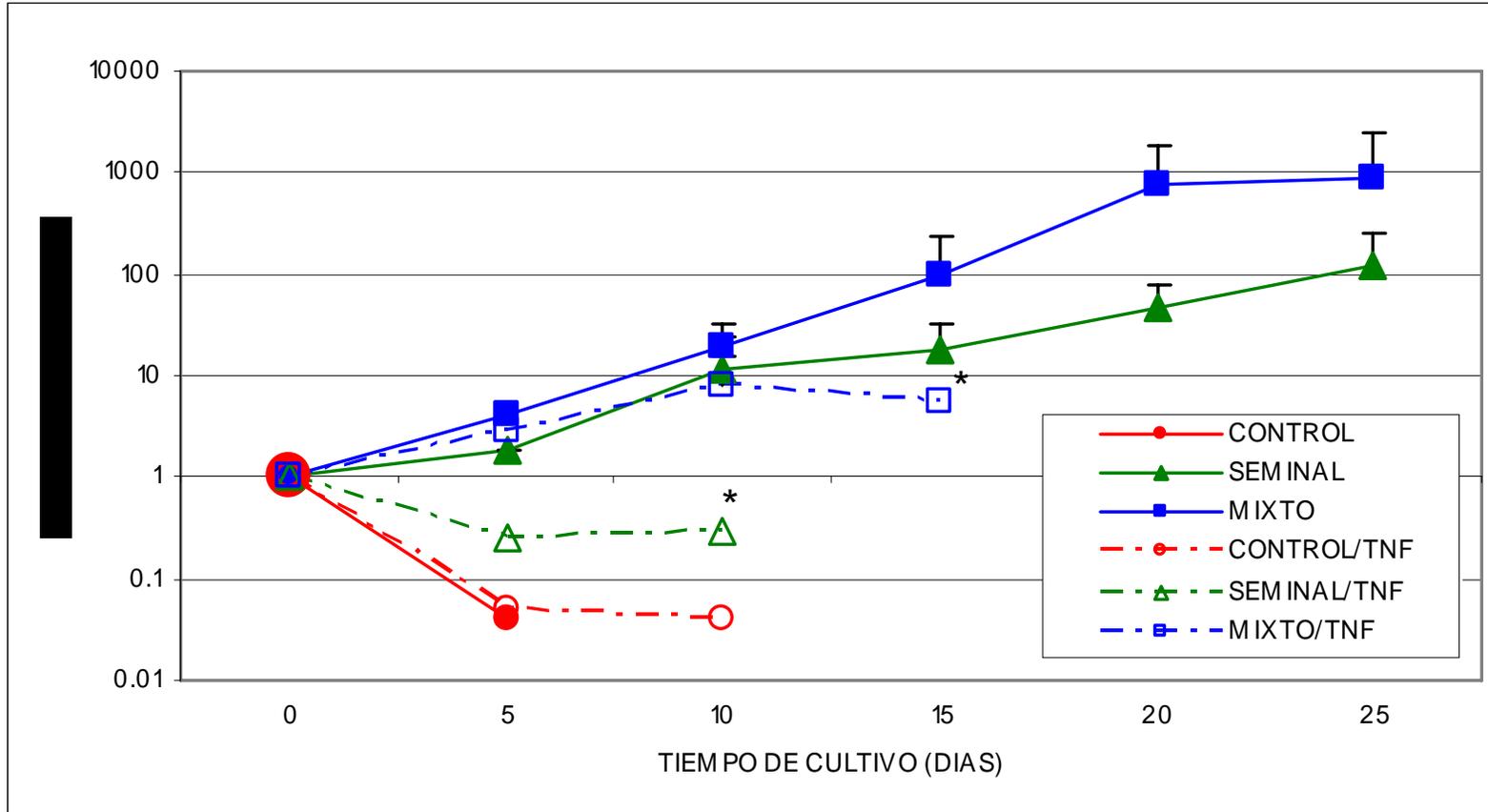


**Figura 15. Proliferación de células CD34+CD38-LIN- de LMC en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas en presencia o ausencia de TNF $\alpha$ .** Células de LMC (n=12) fueron cultivadas en medio de expansión libre de citocinas (CONTROL), medio de expansión en presencia de una combinación seminal (SEMINAL), medio de expansión mas la combinación de citocinas mixta (MIXTO), medio de expansión en las diferentes combinaciones de citocinas mas TNF $\alpha$  (CONTROL/TNF; SEMINAL/TNF; MIXTO/TNF). A los diferentes cultivos se les realizó un cambio de medio cada 5 días y el incremento celular en veces se calculó al extrapolar el número existente en cada día de cultivo con el número celular contado en el cambio de medio inmediato anterior. Los cultivos fueron mantenidos mientras había células en las diferentes condiciones. No hay diferencias significativas.

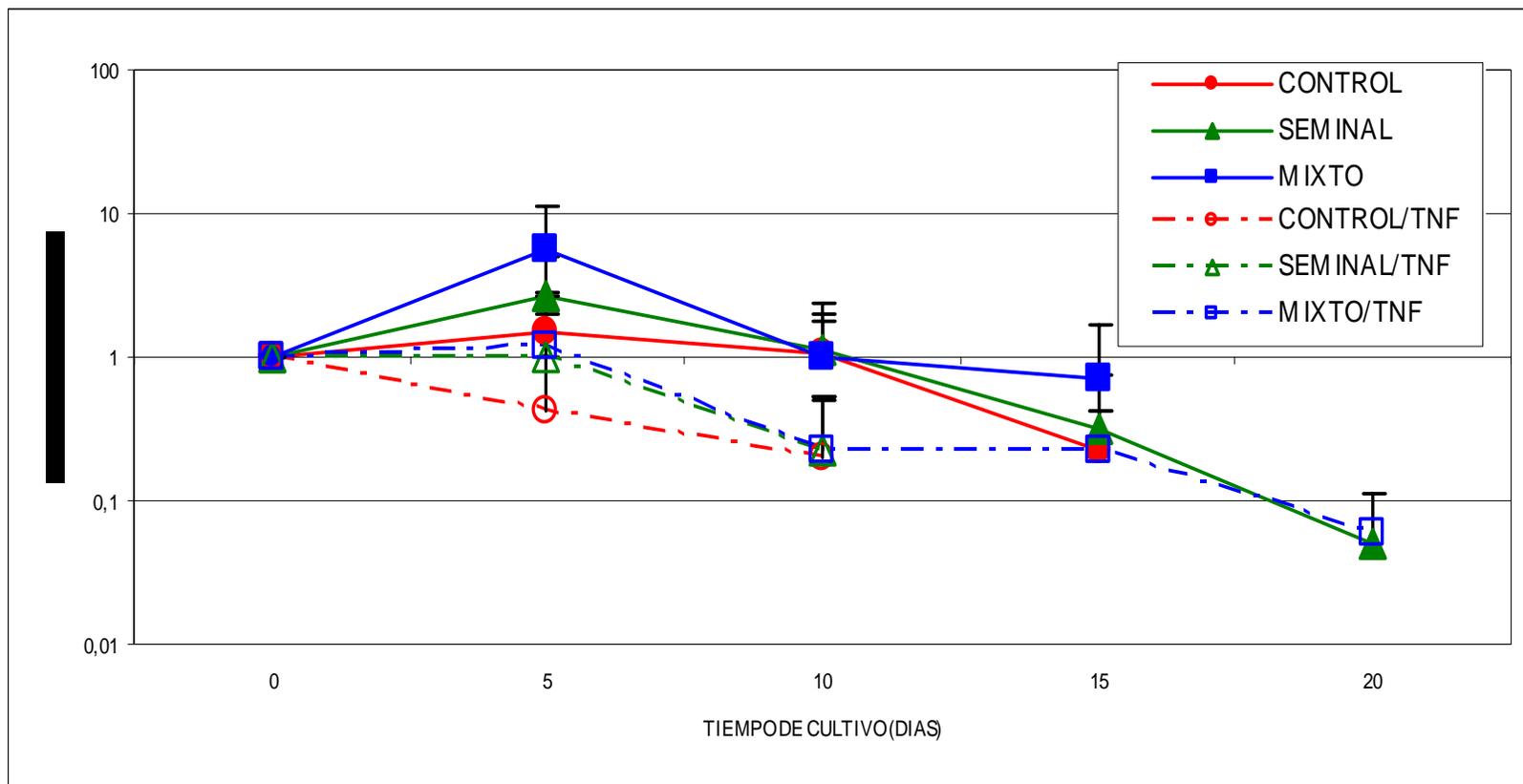
Aunado a ello, cuando se comparó el efecto del  $\text{TNF}\alpha$  en las poblaciones  $\text{CD34}^+\text{CD38}^-\text{LIN}^-$  de MON y LMC se observó que las células de MON son más sensibles al efecto inhibitorio del  $\text{TNF}\alpha$  en los días 15 y 20 de cultivo. Sin embargo, en los días 5 y 10 de cultivo las células procedentes de LMC son más responsivas al efecto inhibitorio del  $\text{TNF}\alpha$ . En relación a este punto, Despres y colaboradores (1995) han descrito que el  $\text{TNF}\alpha$  actúa preferencialmente en los compartimientos de células progenitoras más maduras, lo que podría sugerir que bajo nuestras condiciones de cultivo, las células de LMC podrían tener acelerado su proceso de maduración, y esto las hace más sensibles al  $\text{TNF}\alpha$  en los primeros días del cultivo, mientras que en el caso de las células de MON el efecto se observa en los últimos días del cultivo, tiempo en el que de manera normal han iniciado su proceso de maduración.

En cuanto a la capacidad de expansión, se observó que las células  $\text{CD34}^+\text{CD38}^-\text{LIN}^-$  de MON provenientes de la combinación seminal y mixta sin  $\text{TNF}\alpha$ , son capaces de expandirse 120 y 893 veces como máximo en los días 25 y 20 respectivamente. No obstante, cuando las células provienen de las combinaciones de citocinas más  $\text{TNF}\alpha$ , sólo se detecta expansión en la combinación mixta, con un incremento máximo de 8 veces en el día 10 (**Figura 16**), lo que representa una inhibición en la expansión de 885 veces.

Un efecto similar se detectó al evaluar la expansión en la población leucémica, donde se observó que no existe capacidad de formar colonias en ninguna de las combinaciones de citocinas empleadas (**Figura 17**), aunque es importante hacer notar que en la combinación mixta hubo una reducción de la expansión de 5.6 a 1.5 veces a día 5 en ausencia y presencia de  $\text{TNF}\alpha$  respectivamente. Si se comparan estos valores con los observados en MON se puede demostrar que al igual que lo que sucede en la subpoblación de células progenitoras  $\text{CD34}^+\text{LIN}^-$ , son más sensibles al efecto inhibitorio de  $\text{TNF}\alpha$  las células  $\text{CD34}^+\text{CD38}^-\text{LIN}^-$  provenientes de MON.



**Figura 16. Expansión de células CD34+CD38-LIN- de MON en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas en presencia o ausencia de TNF $\alpha$ .** Una alícuota de las células sembradas en las diferentes combinaciones de cultivo en presencia y ausencia de TNF $\alpha$  fueron cultivadas en medio semisólido para evaluar el número de CFC. Las colonias detectadas después de 14 días de cultivo, fueron extrapoladas con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, y el incremento en veces se calculó en relación con el número de CFC determinado en el día cero de cultivo. Células de MON provenientes de cultivos en medio de expansión libre de citocinas en presencia y ausencia de TNF $\alpha$  (CONTROL y CONTROL/TNF respectivamente), células provenientes de la combinación seminal en ausencia y presencia de TNF $\alpha$  (SEMINAL y SEMINAL/TNF), células provenientes de la combinación mixta en ausencia y presencia de TNF $\alpha$  (MIXTO Y MIXTO/TNF). (\*P<0.05 con respecto a la misma condición de cultivo sin TNF).



**Figura 17. Expansión de células CD34+CD38-LIN- de LMC en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas en presencia o ausencia de TNF $\alpha$ .** Una alícuota de las células sembradas en las diferentes combinaciones de cultivo en presencia y ausencia de TNF $\alpha$  fueron sembradas en medio semisólido para evaluar el número de CFC. Las colonias detectadas después de 14 días, fueron extrapoladas con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, y el incremento en veces se calculó en relación con el número de CFC determinado en el día cero. Células de MON provenientes de cultivos en medio de expansión libre de citocinas en presencia y ausencia de TNF $\alpha$  (CONTROL y CONTROL/TNF respectivamente), células provenientes de la combinación seminal en ausencia y presencia de TNF $\alpha$  (SEMINAL y SEMINAL/TNF), células provenientes de la combinación mixta en ausencia y presencia de TNF $\alpha$  (MIXTO Y MIXTO/TNF). No hay diferencias significativas.

Al evaluar el tipo de colonias obtenidas, se encontró que en el caso de LMC tratada con  $TNF\alpha$  las colonias se encuentran distribuidas en los linajes mieloides y eritroides (**Tabla 10**), lo que no sucedió en las colonias generadas en los cultivos sin  $TNF\alpha$ , en donde se registraron colonias preferencialmente eritroides en los primeros días de cultivo (ver tabla 8).

Sin embargo, en la población  $CD34+CD38-LIN-$  de MON cultivada en presencia de  $TNF\alpha$ , se observa una clara tendencia a generar colonias de tipo mieloides, aunque estas colonias sólo son detectadas en el día 5, bajo cualquier combinación de citocinas, lo que no ocurrió cuando las células de MON se cultivaron en ausencia de  $TNF\alpha$  (ver tabla 8), en donde las colonias se mantuvieron distribuidas en los linajes mieloides y eritroides. Estos hallazgos sugieren dos posibilidades: que el  $TNF\alpha$  tenga la capacidad de inhibir preferencialmente al linaje eritroide y que esta citocina, además de inhibir la capacidad formadora de colonias en células  $CD34+CD38-LIN-$  de MON y LMC, sea capaz de inducir preferencialmente la diferenciación mieloides en células  $CD34+CD38-LIN-$  de MON. Este dato correlaciona con lo reportado por Dybedal y colaboradores (2001), quienes al cultivar células  $CD34+CD38-$  provenientes de médula ósea normal en presencia de  $TNF\alpha$ , encontraron que se promueve la diferenciación mieloides, sin incrementar la apoptosis o modificar la distribución en el ciclo celular, por lo que además propuso que el  $TNF\alpha$  puede regular a las células troncales hematopoyéticas mediante la promoción de su diferenciación mas que por la regulación de la proliferación o autorrenovación.

**Tabla 10.** Porcentaje de CFC mieloides, eritroides y mixtas en células CD34+CD38-LIN- de MON y LMC a diferentes días y condiciones de cultivo mas TNF $\alpha$ .

		CONTROL			SEMINAL			MIXTA		
		Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix
Día 5	MON	100	0	0	97	3	0	83	17	0
	TNF	( $\pm$ 1)			( $\pm$ 2)	( $\pm$ 2)		( $\pm$ 8)	( $\pm$ 4)	
	LMC	42.6*	57.4*	0	40*	58*	2	37.6*	62.4*	0
	TNF	( $\pm$ 13)	( $\pm$ 9)		( $\pm$ 4)	( $\pm$ 6)	( $\pm$ 1)	( $\pm$ 7)	( $\pm$ 8)	
Día 10	MON	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	TNF									
	LMC	90.5	9.5	0	39	61	0	76.4	23.6	0
	TNF	( $\pm$ 11)	( $\pm$ 4)		( $\pm$ 4)	( $\pm$ 7)		( $\pm$ 9)	( $\pm$ 6)	
Día 15	MON	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	TNF									
	LMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	68.5	31.5	0
	TNF						( $\pm$ 13)	( $\pm$ 11)		

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de las diferentes CFC evaluadas después de 14 días en cultivos semisólidos. Las células provenían de cultivos líquidos en la condición control libre de citocinas (CONTROL), de la combinación seminal (SEMINAL) y de la combinación mixta (MIXTA), a los días 5, 10 y 15 de cultivo en presencia de TNF $\alpha$ . nd, indica que no se determino por falta de células. (\*P < 0.05 con respecto a MON).

Los datos anteriores demuestran que el  $TNF\alpha$  es capaz de inhibir la proliferación y la expansión *in vitro* de células troncales y progenitoras de LMC así como de MON, siendo mayor su efecto en estas últimas. Sin embargo, aunque el  $TNF\alpha$  se considera un potente inhibidor de la proliferación tumoral (incluso ha sido utilizado para el tratamiento de diferentes neoplasias), no existen datos en donde pacientes con LMC hayan sido tratados exclusivamente con esta molécula, por lo que no es considerado un agente terapéutico.

Referente a este último punto, actualmente existen diferentes opciones de tratamiento para pacientes con LMC, éstos incluyen biomoduladores como el  $IFN\alpha$ , el trasplante de células hematopoyéticas (TCH) o incluso el recientemente diseñado STI571. Estos tratamientos han mostrado diferentes capacidades para inducir remisiones citogenéticas y moleculares, y aunque actualmente en México el  $IFN\alpha$  es el método estándar para tratamiento de LMC, la única opción curativa sigue siendo el TCH.

## 2. Caracterización de la subpoblación CD34+LIN- obtenida de pacientes que han alcanzado la remisión hematológica.

### 2.1. Caracterización de la subpoblación CD34+LIN-

Las CTH de pacientes con LMC que no han recibido ningún tipo de tratamiento han sido descritas en la literatura desde muy diversos aspectos (biológico, molecular y clínico), lo que ha permitido entender la biología básica de la enfermedad. Sin embargo existe muy poca información acerca del comportamiento *in vitro* de las CTH provenientes de pacientes que han recibido estímulos terapéuticos, aunque se conoce que las diferentes terapias son capaces de disminuir la población celular total, inducir apoptosis, e incluso causar remisiones citogenéticas y moleculares.

A este respecto, el saber que existen poblaciones Bcr-Abl altamente quiescentes y que son resistentes al efecto de agentes quimioterapéuticos, ha llevado a considerar que estas subpoblaciones presentan características especiales, por lo que entender la biología básica de estas células ha tomado un papel central en el estudio de la LMC.

De acuerdo con lo anterior y con el objetivo de contribuir a la descripción de células progenitoras hematopoyéticas, se procedió a determinar la capacidad de proliferación y expansión de la subpoblación CD34+LIN- de LMC después de haber sido tratada *in vivo*, con  $INF\alpha$ , STI571 y TCH.

Para ello, muestras de Médula Osea de 5 pacientes tratados con  $INF\alpha$ , 8 de pacientes tratados con STI571 y 8 de pacientes post-trasplantados fueron colectadas y enriquecidas mediante selección negativa en la subpoblación de células progenitoras CD34+LIN-.

Los resultados indican (**Tabla 11**), que las muestras que provienen de pacientes con LMC que han recibido algún tipo de tratamiento, tienen números reducidos de CMN y células CD34+LIN-, en relación con MON y con las muestras de LMC virgen de tratamiento (LMC VT), en donde las diferencias son más

significativas. Cuando en las distintas muestras se evaluó el porcentaje de células positivas al antígeno CD34, se encontró que en la fracción de CMN así como en la fracción enriquecida en células CD34+LIN- provenientes de muestras de pacientes tratados existe un menor número de células CD34+, lo que también sucedió al cuantificar el número de CFC ya que éstas se encuentran disminuidas en relación con las CFC obtenidas en las muestras de MON e incluso el decremento es aún mayor con respecto a las muestras de LMC VT. Cabe mencionar, que a pesar de esta disminución, el enriquecimiento obtenido es mayor en las muestras tratadas con IFN $\alpha$ , TCH y STI571 ya que se obtienen 18.6, 21.1 y 33.8 veces respectivamente, mientras que en las células provenientes de MON y de LMC VT, la población se enriquece 10.6 y 12.1 veces respectivamente.

Estos datos demuestran que a pesar de que los diferentes tratamientos provocan un decremento en el número de CFC, el método de selección utilizado permite trabajar con una subpoblación enriquecida en células progenitoras hematopoyéticas.

**Tabla 11.** Datos generales a día cero de la subpoblación CD34+LIN- de MON y LMC después de diferentes opciones de tratamiento.

	MON (n=5)	LMC VT (n=12)	LMC IFN $\alpha$ (n=5)	LMC TCH (n=8)	LMC STI (n=8)
CMN ( $\times 10^6$ )	44.2 ( $\pm 13$ )	63 ( $\pm 30$ )	22.5* ( $\pm 24.9$ )	9.9*^ ( $\pm 8.6$ )	19.6* ( $\pm 26$ )
CD34 <sup>+</sup> LIN <sup>-</sup> ( $\times 10^3$ )	1849 ( $\pm 877$ )	4691 ( $\pm 3160$ )	536* ( $\pm 661$ )	339*^ ( $\pm 228$ )	582* ( $\pm 123$ )
% DE RECUPERACION	4.3 ( $\pm 1.4$ )	8.1 ( $\pm 6.4$ )	1.8 ( $\pm 0.7$ )	2.8 ( $\pm 2.5$ )	1.5 ( $\pm 1.4$ )
% DE CD34+ (CMN)	2.1 ( $\pm 0.7$ )	2.3 ( $\pm 1.5$ )	1.6 ( $\pm 1.1$ )	1 ( $\pm 0.8$ )	1.5 ( $\pm 1$ )
% DE CD34+ (CD34 <sup>+</sup> LIN <sup>-</sup> )	58 ( $\pm 19.7$ )	34 ( $\pm 11$ )	31.6 ( $\pm 25.5$ )	18^ ( $\pm 15$ )	25^ ( $\pm 12$ )
CFC / 100,000 (CMN)	676 ( $\pm 329$ )	695 ( $\pm 438$ )	224 ( $\pm 200$ )	207 ( $\pm 200$ )	170^ ( $\pm 187$ )
CFC / 100,000 (CD34 <sup>+</sup> LIN <sup>-</sup> )	6209 ( $\pm 1840$ )	7040 ( $\pm 4902$ )	3560 ( $\pm 3470$ )	3490 ( $\pm 3333$ )	2925 ( $\pm 1641$ )
ENRIQUECIMIEN TO (VECES)	10.6 ( $\pm 4.4$ )	12.1 ( $\pm 9.1$ )	18.6 ( $\pm 11$ )	21.1 ( $\pm 11.7$ )	33.8 ( $\pm 25$ )

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 muestras de MON (MON), 12 muestras de LMC Virgen de Tratamiento (LMC VT), 5 muestras de LMC tratadas con IFN $\alpha$  (LMC IFN $\alpha$ ), 8 muestras de LMC tratadas con TCH (LMC TCH) y 8 de LMC tratadas con STI571 (LMC STI). Células Mononucleares (CMN) obtenidas por gradiente de ficoll, fueron enriquecidas en la subpoblación CD34+LIN- (CD34+LIN-). En ambas poblaciones se determinó el número de células positivas al antígeno CD34 (% de CD34+) y el número de Células Formadoras de Colonias por cada 100,000 células sembradas (CFC/100,000). El % de recuperación representa la cantidad de células que se obtuvieron después de la selección negativa, en relación con las CMN (consideradas el 100%) y el enriquecimiento indica las CFC obtenidas en la población CD34+LIN- dividido entre las CFC obtenidas en la población de CMN. (\*P < 0.05 con respecto a las muestras de pacientes con CML VT y ^ con respecto a MON).

Es importante mencionar que la mayoría de las colonias generadas en el momento de procesar las muestras, correspondían al linaje eritroide, aunque esto fue mas evidente en las muestras de LMC VT, ya que en las muestras después de tratamiento, el % de CFC eritroides disminuyó, mientras que el % de CFC mieloides se incrementó (**Tabla 12**). Este dato asociado a que se conoce que la presencia del rearrreglo Bcr-Abl favorece la diferenciación eritroide, podría sugerir que las diferentes opciones terapéuticas tienen como principal blanco las células Bcr-Abl positivas, y esto explique porque las CFC provenientes de pacientes con LMC que ha recibido algún tipo de tratamiento sean preferencialmente mieloides.

**Tabla 12.** Porcentaje de CFC mieloides, eritroides y mixtas a día cero en CMN y CD34+LIN- de MON y LMC después de diferentes opciones de tratamiento

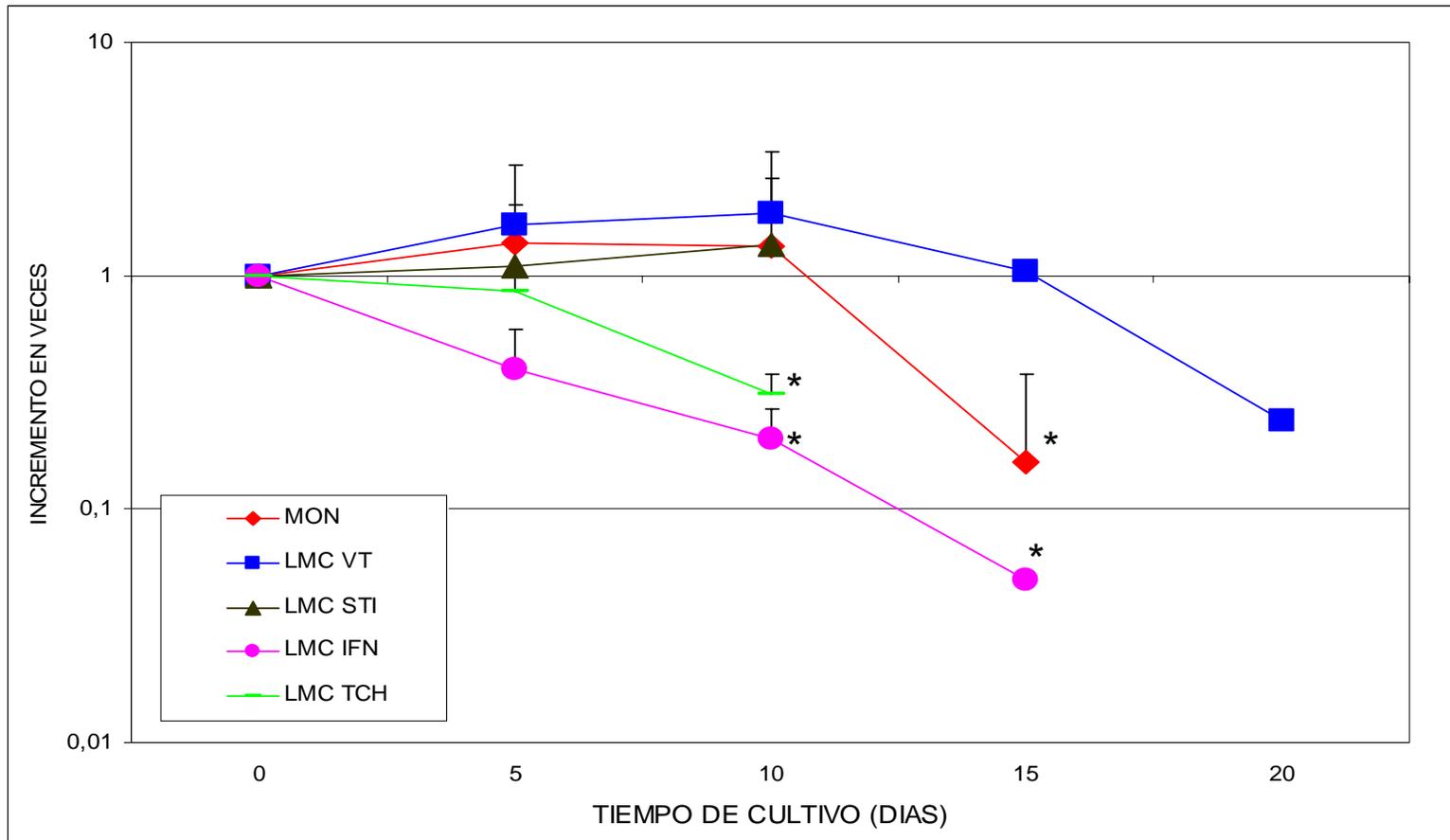
	MON		LMC VT		LMC IFN		LMC TCH		LMC STI	
	CMN	CD34	CMN	CD34	CMN	CD34	CMN	CD34	CMN	CD34
MIELOIDE (%)	37 (± 5)	35.5 (± 3)	25 (± 19)	18.5 (± 13)	33 (± 19)	30 (± 30)	32 (± 22)	26 (± 23)	42 (±17)	28 (±14)
ERITROIDE (%)	61 (± 6)	63 (± 4)	74.5 (± 29)	81 (± 14)	67 (± 19)	70 (± 39)	68 (± 24)	74 (± 23)	55 (±17)	71 (±15)
MIXTA (%)	2 (± 0)	1.5 (± 0.5)	0.5 (± 0.1)	0.5 (± 0.3)	0	0	0	0	3 (±2)	1 (±0.5)

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de las diferentes CFC evaluadas después de 14 días en cultivos semisólidos. Las células provenían de muestras de Médula Osea Normal (MON) y LMC Virgen de Tratamiento (LMC VT) y LMC tratadas con Interferón alfa (LMC IFN), Trasplante de Células Hematopoyéticas (LMC TCH) y el inhibidor STI571 (LMC STI). (\*P < 0.05 con respecto a las muestras vírgenes de tratamiento).

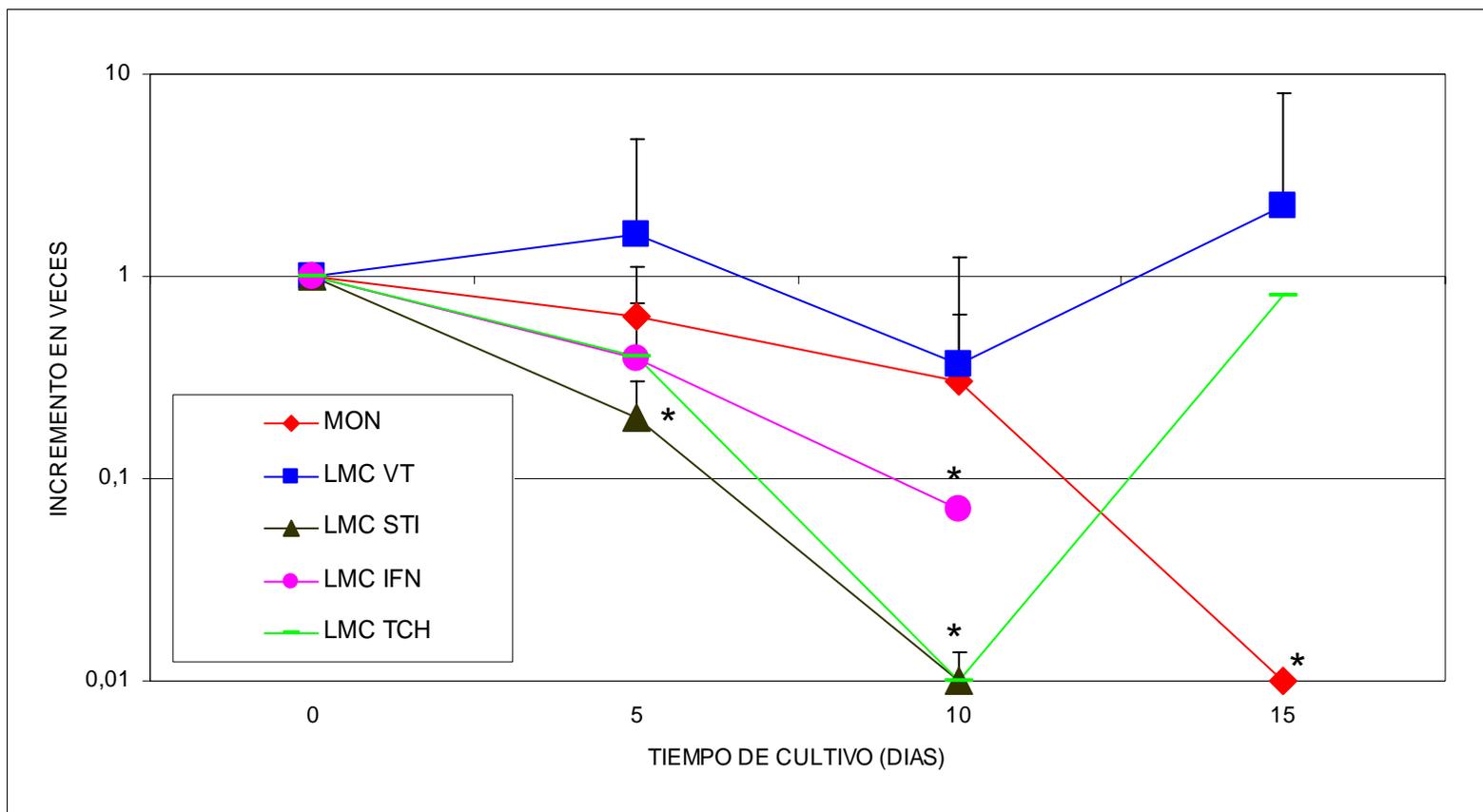
Una vez que se enriquecieron las diferentes subpoblaciones celulares, se procedió a evaluar su capacidad para responder al estímulo con diferentes condiciones de cultivo *in-vitro*.

En la primera condición, las células CD34+LIN- fueron sembradas en medio de expansión libre de citocinas (control), y se encontró que existe un decremento drástico en los números celulares, incluso no hay células detectables para el día 20 de cultivo. Este decremento fue más evidente en los cultivos de LMC de pacientes tratados con IFN $\alpha$ , TCH o STI571. En contraste, el número celular en cultivos de LMC VT se mantuvo constante por los primeros 15 días, al cabo de los cuales ya no se detectaron células en los cultivos (**Figura 18**),

En lo referente a la expansión, se encontró que en ausencia de citocinas las células CD34+LIN- de LMC no son capaces de generar colonias, incluso la disminución de éstas es mucho más evidente que en las células de MON, en donde tampoco se detectan CFC. Cabe mencionar que las únicas células que son capaces de generar CFC son las de LMC VT, las cuales mantuvieron un incremento de 2.2 veces en el día 15 de cultivo (**Figura 19**).



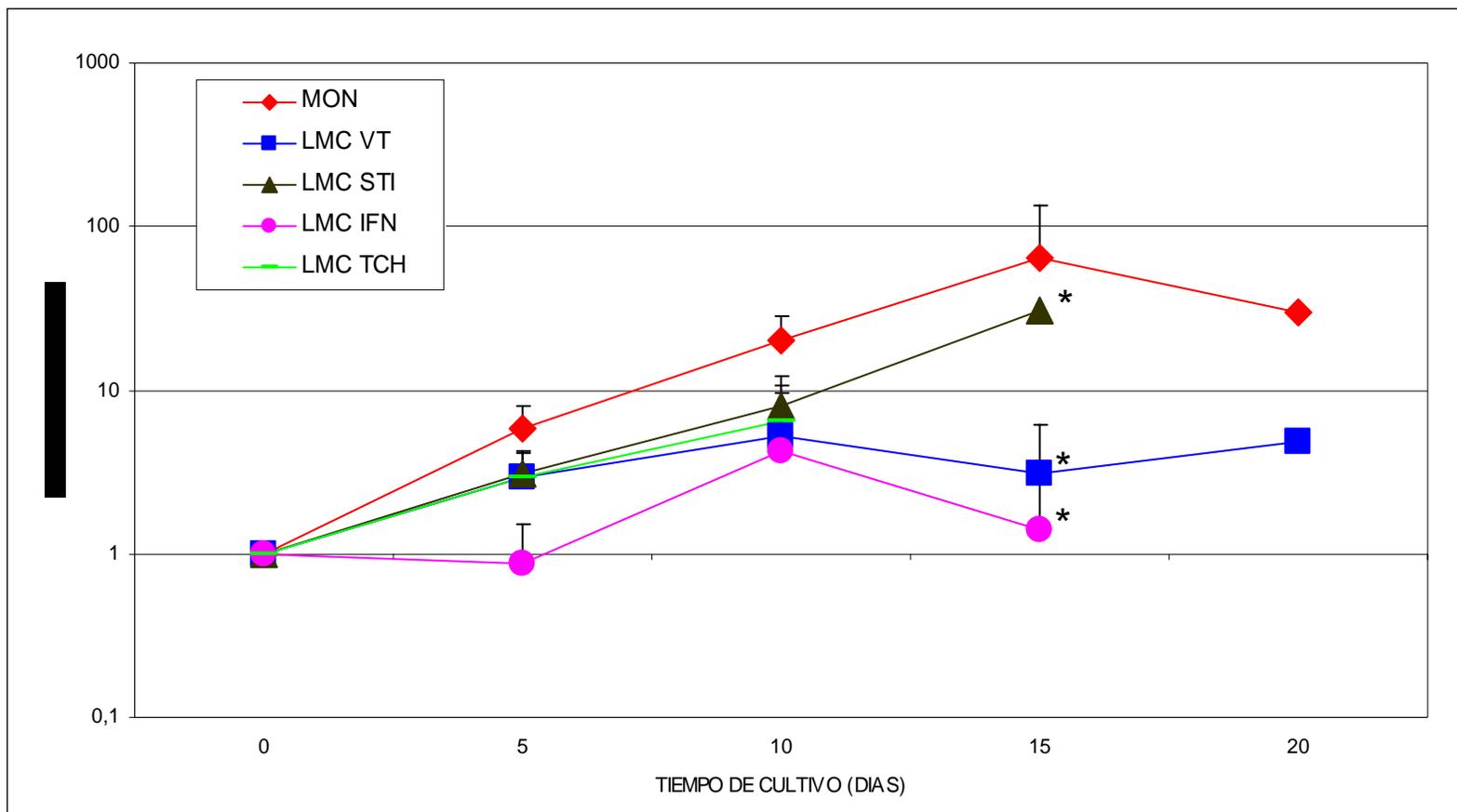
**Figura 18. Proliferación en ausencia de citocinas de células CD34+LIN- de MON y de pacientes con LMC que han recibido distintos tratamientos.** Células de MON (n=5), LMC virgen de tratamiento (LMC VT; n=12) LMC tratada con STI571 (LMCSTI; n=8), LMC tratada con Interferón  $\alpha$  (LMC INF; n=5) y LMC tratada con trasplante de célula hematopoyéticas (LMN TCH; n=8) fueron cultivadas en ausencia de citocinas. A los diferentes cultivos se les realizó un cambio de medio cada 5 días y el incremento celular en veces se calculó al extrapolar el número existente en cada día de cultivo con el número celular contado en el cambio de medio inmediato anterior. (\* $P < 0.05$  con respecto a las muestras vírgenes de tratamiento)



**Figura 19. Expansión en ausencia de citocinas de células CD34+LIN- de MON y de pacientes con LMC que han recibido distintos tratamientos.** Una alícuota de las células provenientes de los cultivos libres de citocinas fueron sembradas en medio semisólido para evaluar el número de CFC. Las colonias detectadas después de 14 días, fueron extrapoladas con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, y el incremento en veces se calculó en relación con el número de CFC determinado en el día cero. Células provenientes de Médula Ósea Normal (MON; n=5), Células provenientes de Leucemia Mieloide Crónica virgen de tratamiento (LMC VT; n=12), LMC tratada con STI571 (LMCSTI; n=8), LMC tratada con Interferón  $\alpha$  (LMC IFN; n=5), y LMC tratada con transplante de células hematopoyéticas (LMC TCH; n=8). (\*P<0.05 con respecto a las muestras de pacientes vírgenes de tratamiento).

El no haber encontrado proliferación y expansión en esta condición de cultivo era un dato esperado, ya que se conoce que las células troncales y progenitoras hematopoyéticas provenientes de MON, son incapaces de permanecer *in-vitro* cuando no reciben estimulación con citocinas. Sin embargo, en el caso de las células de LMC VT, los resultados pueden asociarse con los trabajos del grupo de Holyoake (2001), quienes mencionan que células troncales de LMC son capaces de secretar factores de crecimiento (particularmente G-CSF e IL-3), por lo que podrían estimularse de manera autócrina.

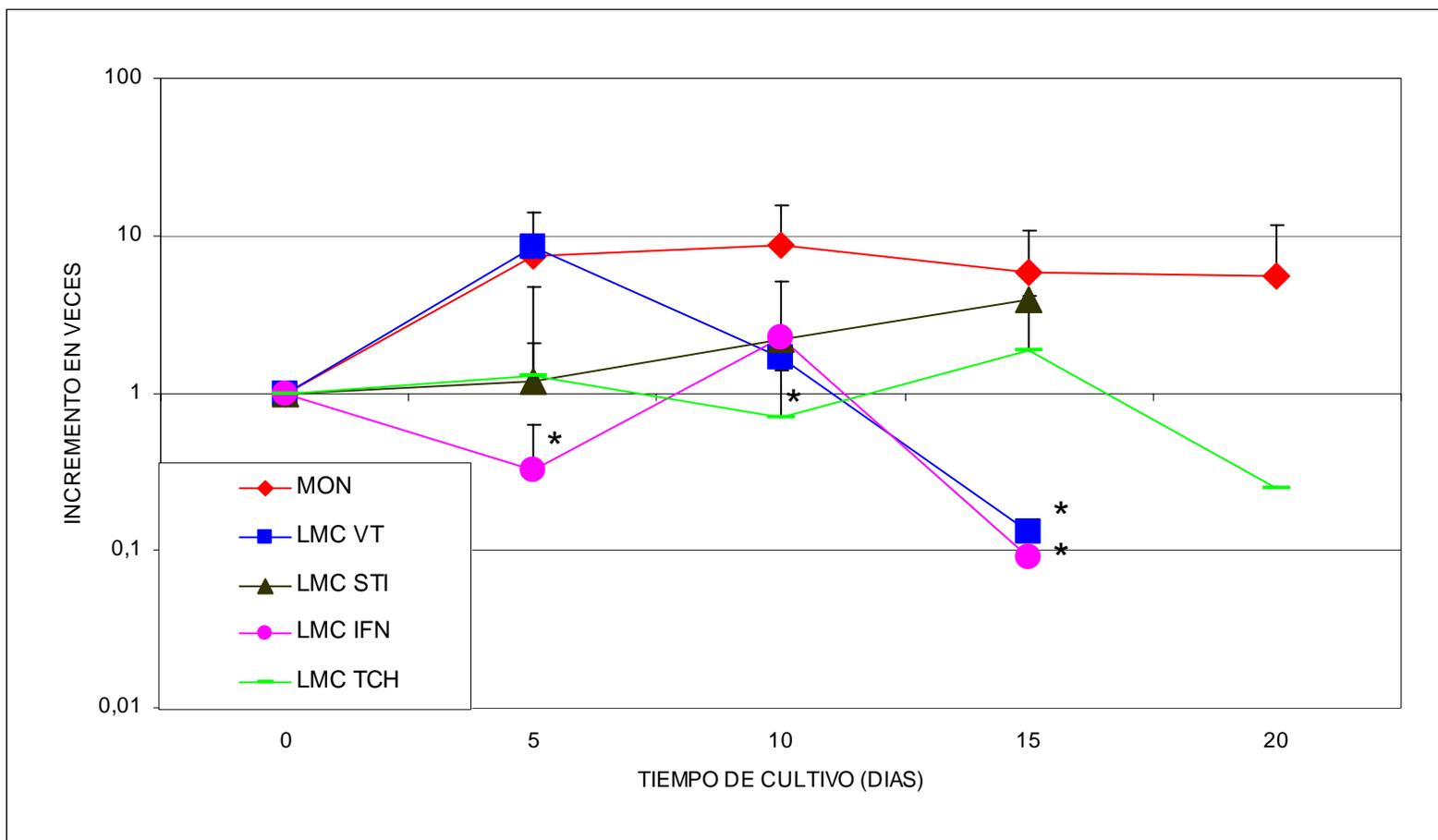
Cuando las células de MON y LMC se cultivaron en la combinación seminal (que incluye citocinas involucradas con el mantenimiento y sobrevivencia de las células), se encontró (**Figura 20**) que todas las células son capaces de proliferar, aunque sus potenciales son diferentes, ya que como era de esperarse las células con mayor capacidad de proliferación son las procedentes de MON (con un máximo de 64.2 al día 15), seguidas por las muestras de LMC que fueron tratadas con STI571 (con un incremento de 31 veces al día 15) y las que recibieron trasplante de células hematopoyéticas (con un máximo de 6 veces a día 10), aunque estas dos últimas no permanecen en cultivo el mismo tiempo que las de MON. Un dato importante, es que las muestras tratadas con IFN $\alpha$  tienen potenciales de proliferación similares (4.2 veces a día 10) a los observados en las muestras vírgenes de tratamiento (5.2 veces a día 10).



**Figura 20. Proliferación de células CD34+LIN- de MON y de pacientes con LMC que han recibido distintos tratamientos en presencia de la combinación seminal.** Células de Médula Ósea Normal (MON; n=5), LMC virgen de tratamiento (LMC VT; n=12); LMC tratada con STI571 (LMCSTI; n=8), LMC tratada con Interferón  $\alpha$  (LMC INF; n=5) y LMC tratada con trasplante de célula hematopoyéticas (LMN TCH; n=8) fueron cultivadas en presencia de la combinación de citocinas seminal. A los diferentes cultivos se les realizó un cambio de medio cada 5 días y el incremento celular en veces se calculó al extrapolar el número existente en cada día de cultivo con el número celular contado en el cambio de medio inmediato anterior. Los cultivos fueron mantenidos mientras había células en las diferentes condiciones. (\* $P < 0.05$  con respecto a MON).

Cuando a estas mismas células se les evaluó su capacidad de expansión (**Figura 21**), se detectó que las de MON son las únicas capaces de formar colonias hasta el día 20 de cultivo, mientras que las que se obtuvieron de muestras con LMC tienen disminuida su capacidad de expandirse. Cabe mencionar que en el caso de las muestras de pacientes con LMC VT, así como las que provenían de pacientes tratados con  $IFN\alpha$ , las CFC alcanzan niveles no detectables desde los primeros 5 días de cultivo, lo que no sucede en el caso de las muestras tratadas con STI571 o con TCH, ya que en ellas se observa que las CFC se mantienen, e incluso se observó una ligera expansión en las muestras tratadas con STI571 (3.9 veces en el día 15).

Los resultados encontrados dejan ver que a pesar del tratamiento, las células provenientes de LMC aún mantienen deficiencias en sus capacidades de proliferación y expansión, lo que indica que su comportamiento hematopoyético sigue alterado. Esta observación se hace más evidente si se compara la expansión de los diferentes cultivos leucémicos, con el de MON, en donde se observa que las citocinas ejercen un claro efecto de mantenimiento de los cultivos, ya que la expansión celular permanece entre 8 y 6 veces hasta el día 20 de cultivo, lo que no se observa en el resto de los cultivos.



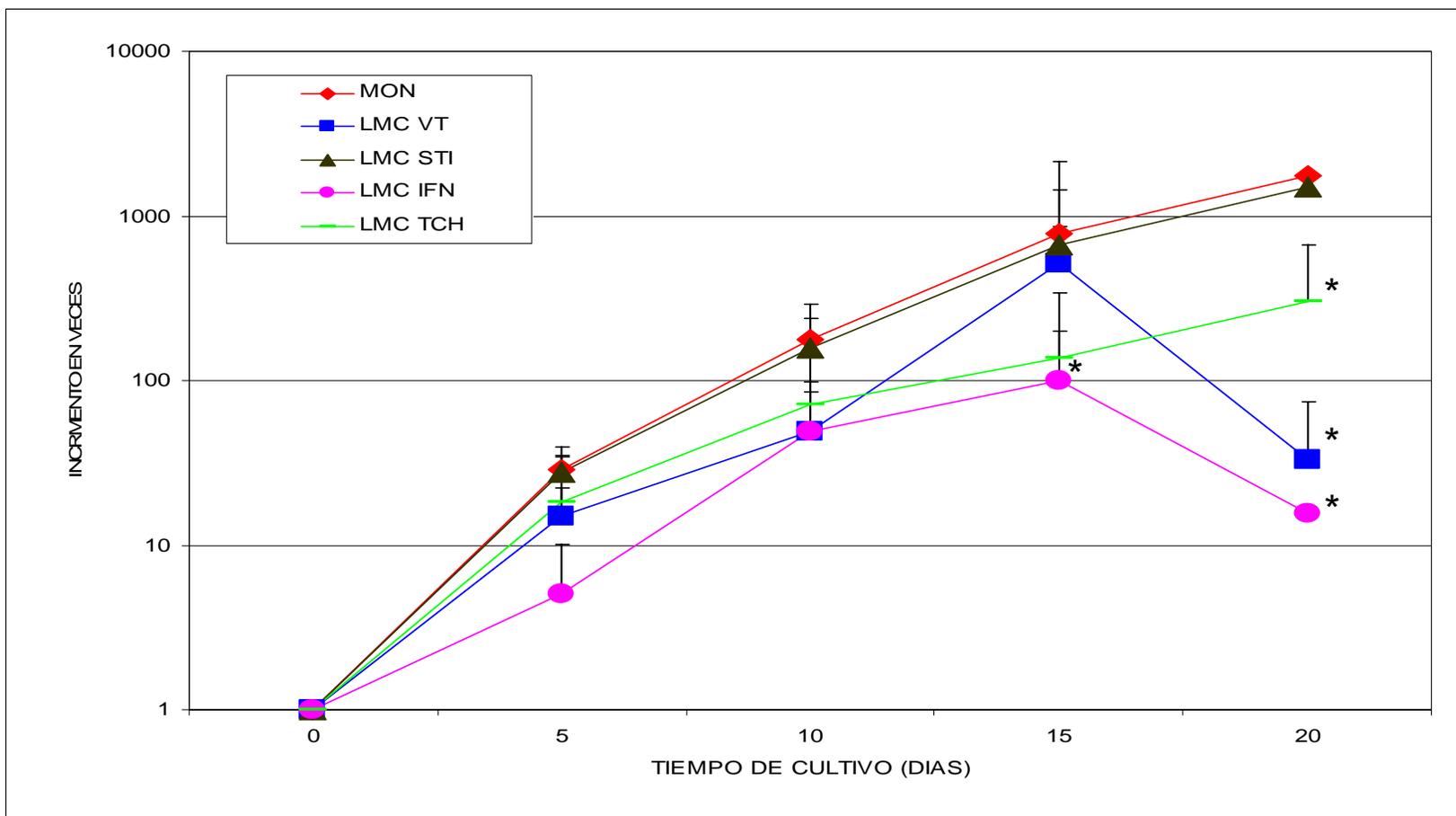
**Figura 21. Expansión de células CD34+LIN- de MON y de pacientes con LMC que han recibido distintos tratamientos en presencia de la combinación seminal.** Una alícuota de las células provenientes de los cultivos suplementados con la combinación de citocinas seminal fueron sembradas en medio semisólido para evaluar el número de CFC. Las colonias detectadas después de 14 días, fueron extrapoladas con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, y el incremento en veces se calculó en relación con el número de CFC determinado en el día cero. Células provenientes de Médula Ósea Normal (MON; n=5), Células provenientes de Leucemia Mieloide Crónica virgen de tratamiento (LMC VT; n=12), LMC tratada con STI571 (LMCSTI; n=8), LMC tratada con Interferón  $\alpha$  (LMC IFN; n=5), y LMC tratada con transplante de células hematopoyéticas (LMC TCH; n=8). (\*P<0.05 con respecto a MON)

Finalmente, cuando las células CD34+LIN- se cultivaron en presencia de la combinación de citocinas mixta (**Figura 22**), se encontró que todas las células responden al estímulo de mejor manera que cuando las células se cultivaron en la combinación seminal.

Un primer dato que llama la atención es que todas las células permanecen en el cultivo hasta 25 días y particularmente en el caso de MON y LMC tratada con STI571 se alcanzan incrementos muy similares que corresponden a 1753 y 1500 veces, respectivamente. Este dato es de gran relevancia, ya que sugiere que las muestras de LMC tratadas con STI571 han recuperado su potencial hematopoyético, y que en el momento de tomar la muestra, las células presentes en Médula Osea correspondían a una población aparentemente normal.

Las muestras de LMC pos trasplante también muestran una recuperación en su potencial proliferativo (322 veces como máximo), aunque no llega a ser tan evidente como el detectado en las muestras de LMC tratadas con STI571, ya que solo representa una quinta parte de la proliferación alcanzada por estas últimas.

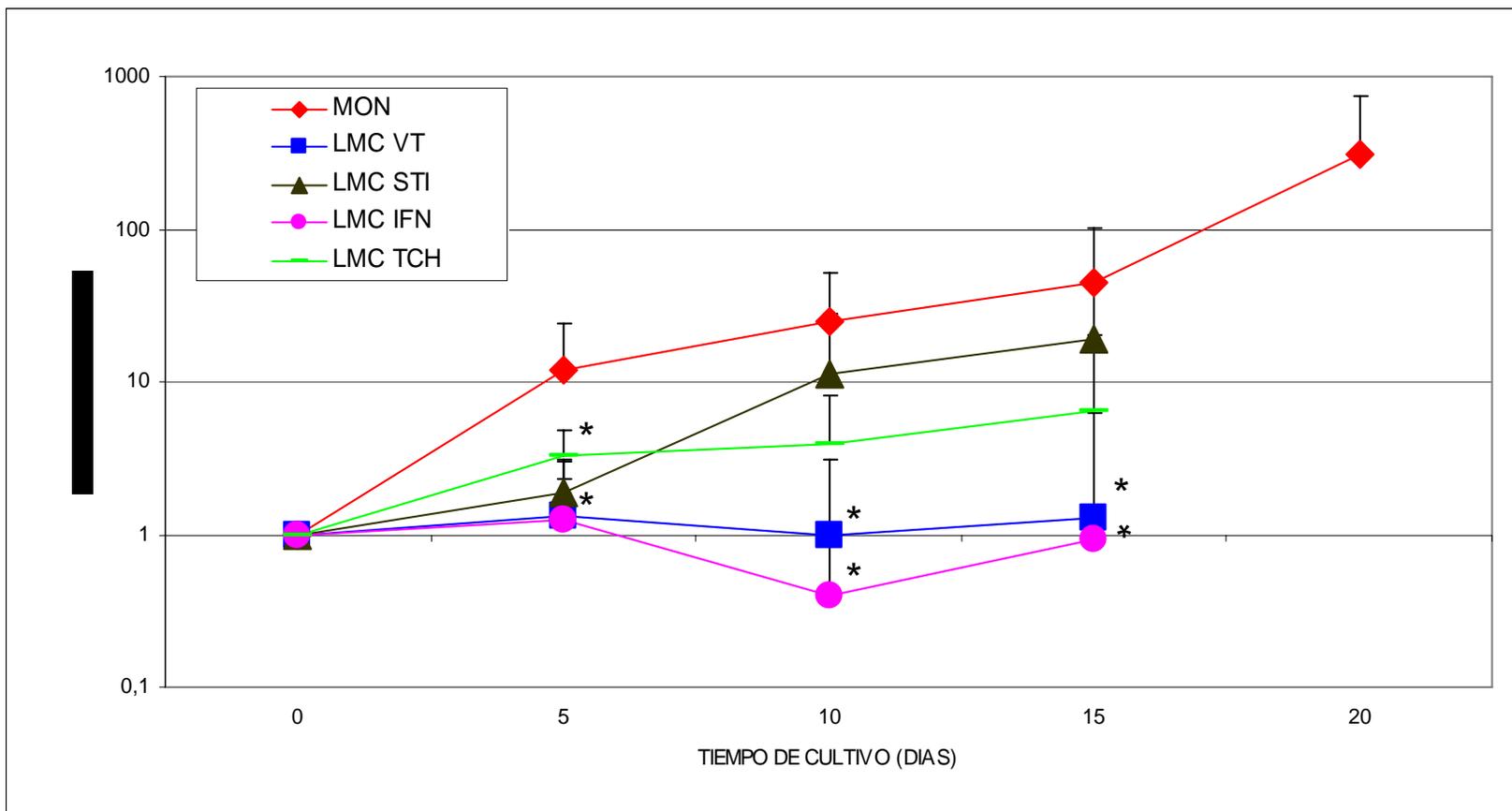
En cuanto a las muestras de LMC tratadas con IFN $\alpha$ , se puede observar que aunque responden de mejor forma (99 veces de incremento a día 15 de cultivo) que en la condición seminal, no son capaces de superar la proliferación encontrada en las muestras vírgenes de tratamiento (520 veces de incremento máximo a día 15). Este resultado es de gran interés, ya que *in-vivo* los pacientes mostraron una recuperación hematológica completa y respuesta citogenética mayor, lo que indica que a pesar de que éstas células son capaces de comportarse *in vivo* de forma muy semejante a la normal, *in vitro* sus capacidades hematopoyéticas se encuentren alteradas.



**Figura 22. Proliferación de células CD34+LIN- de MON y de pacientes con LMC que han recibido distintos tratamientos en presencia de la combinación mixta.** Células de Médula Ósea Normal (MON; n=5), LMC virgen de tratamiento (LMC VT; n=12), LMC tratada con STI571 (LMCST; n=8), LMC tratada con Interferón  $\alpha$  (LMC INF; n=5) y LMC tratada con trasplante de célula hematopoyética (LMN TCH; n=8) fueron cultivadas en presencia de la combinación de citocinas mixta. A los diferentes cultivos se les realizó un cambio de medio cada 5 días y el incremento celular en veces se calculó al extrapolar el número existente en cada día de cultivo con el número celular contado en el cambio de medio inmediato anterior. Los cultivos fueron mantenidos mientras había células en las diferentes condiciones. (\* $P < 0.05$  con relación a MON)

Aunado a lo anterior, al evaluar la capacidad de expansión en estas células, se encontraron comportamientos muy similares a los antes mencionados (**Figura 23**), ya que además de las muestras de MON que lograron expandirse 313.5 veces en el día 25, también las células de LMC tratadas con STI571 y con TCH se expandieron, sólo que su expansión registró valores máximos de 19 y 6.4 veces respectivamente en el día 20 de cultivo. Estos valores fueron reducidos si se comparan con la expansión del día 20 en células de MON que corresponde a 44.1 veces, lo que representó una reducción de 2.3 veces para células tratadas con STI571 y de 6.8 veces para las células tratadas con TCH.

Además, cuando las células provenían de pacientes tratados con IFN $\alpha$  o de muestras de LMC VT, no se detectó capacidad de generar colonias. Este dato en el caso de muestras tratadas con IFN, confirma que *in-vitro*, estas células siguen teniendo un comportamiento leucémico, aunque *in-vivo* los pacientes se encuentren hematológicamente recuperados.



**Figura 23. Expansión de células CD34+LIN- de MON y de pacientes con LMC que han recibido distintos tratamientos en presencia de la combinación mixta.** Una alícuota de las células provenientes de los cultivos suplementados con la combinación de citocinas mixta fueron sembradas en medio semisólido para evaluar el número de CFC. Las colonias detectadas después de 14 días, fueron extrapoladas con las CFC del cambio de medio inmediato anterior, y el incremento en veces se calculó en relación con el número de CFC determinado en el día cero. Células provenientes de Médula Ósea Normal (MON; n=5), Células provenientes de Leucemia Mieloide Crónica virgen de tratamiento (LMC VT; n=12), LMC tratada con STI571 (LMCSTI; n=8), LMC tratada con Interferón  $\alpha$  (LMC IFN; n=5), y LMC tratada con transplante de células hematopoyéticas (LMC TCH; n=8). (\*P<0.05 con respecto a MON).

Cabe mencionar, que de las colonias generadas en los diferentes días y condiciones de cultivo (**Tabla 13**), se observó que las muestras que habían recibido tratamiento con STI571 o trasplante de células hematopoyéticas tenían distribuidas sus CFC en los diferentes linajes hematopoyéticos, tal y como se observó para MON. Sin embargo, la mayoría de las CFC que provenían de pacientes tratados con  $IFN\alpha$ , pertenecían al linaje eritroide, e incluso sus porcentajes fueron superiores a los que se registraron en las muestras vírgenes de tratamiento.

Este dato correlaciona muy bien con el comportamiento registrado anteriormente en la proliferación y la expansión, y todo ello, puede asociarse con que en estas muestras pudiera permanecer el rearrreglo Bcr-Abl, y que como antes se mencionó, favoreciera la diferenciación hacia el linaje eritroide.

**Tabla 13.** Porcentaje de CFC mieloides, eritroides y mixtas a día cero en células CD34+LIN- de MON y LMC después de diferentes opciones de tratamiento y a diferentes días y condiciones de cultivo.

		CONTROL			SEMINAL			MIXTO		
		Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix	Miel	Erit	Mix
DIA 5	MON	52	44	4	43	56	1	35	65	0
	LMC VT	29	71	0	32	68	0	32	68	0
	LMC IFN	6*	94*	0	22	78	0	8*	92*	0
	LMC TCH	52*	48	0	53*	47	0	51	49*	0
	LMC STI	44	56	0	40	60	0	48	52	0
DIA 10	MON	67	33	0	54	44	2	61	39	0
	LMC VT	nd	nd	nd	64	36	0	36	64	0
	LMC IFN	55	45	0	13*	87	0	8*	92	0
	LMC TCH	51	49	0	48	52*	0	56	44	0
	LMC STI	50	50	0	65	35	0	56	44	0
DIA 15	MON	98	2	0	69	30	1	73	27	0
	LMC VT	nd	nd	nd	94	6	0	79	21	0
	LMC IFN	nd	nd	nd	26.5*	73.5*	0	25*	75*	0
	LMC TCH	nd	nd	nd	50*	50*	0	46*	54*	0
	LMC STI	nd	nd	nd	81	19	0	73	27	0

Los datos representan el promedio del porcentaje de las diferentes CFC evaluadas después de 14 días en cultivos semisólidos. Las células provenían de cultivos líquidos en la condición control libre de citocinas (CONTROL), de la combinación seminal (SEMINAL) y de la combinación mixta (MIXTA), a los días 5, 10 y 15 de cultivo, de muestras de MON y LMC VT y tratadas con IFN $\alpha$ , TCH y STI571. nd, indica que no se determino por falta de células. (\*P < 0.05 con relación a muestras vírgenes de tratamiento).

Los resultados descritos anteriormente demuestran que, como sucedió con las células de LMC vírgenes de tratamiento, las células que provienen de pacientes tratados con IFN $\alpha$ , TCH y STI571, también tienen alterados sus patrones de proliferación y expansión *in-vitro*. Las respuestas encontradas pueden estar asociadas con la presencia de Bcr-Abl y su interacción con los agentes terapéuticos administrados, así como con las vías de señalización que estos desencadenen.

A este respecto se ha descrito que el nivel de expresión de ARN y proteína de Bcr-Abl disminuye después del tratamiento con IFN $\alpha$ , al tiempo que induce apoptosis y suprime el crecimiento de células provenientes de LMC (Chen et al, 2002; Selleri et al, 1998). Particularmente en células CD34+ de LMC, se conoce que el IFN $\alpha$  actúa a través de su propio receptor (Ito et al, 2004), el cual puede inhibir cultivos a largo plazo (Cornelissen et al, 1998), así como reducir el crecimiento de células CD34+ mediante el restablecimiento de las interacciones adhesivas de los progenitores con el microambiente (Martin-Henao et al, 2000). Estos datos sugieren entonces, que en las muestras utilizadas en este trabajo, el IFN $\alpha$  es capaz de corregir algunas de las deficiencias de las células leucémicas *in vivo*;; sin embargo este efecto no se hace evidente *in vitro*, ya que a pesar de que los pacientes mostraron una recuperación hematológica, aún mantienen alterado su comportamiento hematopoyético, al grado de tener patrones de proliferación y expansión semejantes a los de las muestras vírgenes de tratamiento.

Otro efecto causado por el IFN $\alpha$  en células de LMC es la inhibición de la generación de células clonogénicas, principalmente por la inhibición directa de los progenitores, hecho que se ha visto ocurre en presencia de Flt-3 (Solanilla et al, 2000). Además esta observación correlaciona con los datos de expansión ya que a pesar de la presencia de diferentes citocinas estimuladoras, las células CD34+LIN- que provienen de pacientes tratados con IFN $\alpha$ , muestran una limitada o nula capacidad de generar colonias *in-vitro*; de las colonias generadas, la mayoría pertenecen al linaje eritroide, lo que indica que el IFN $\alpha$  inhibe preferencialmente el número de CFC mieloides, particularmente granulocito-monocíticas tal y como lo describieron anteriormente Talpaz y otros (1989) así

como y Marley y colaboradores (2000). Sin embargo, estos datos se contraponen con lo descrito en el grupo de Després (1995), quienes al estimular células CD34+ de LMC con SCF, IL-3 y GM-CSF, encontraron que el IFN $\alpha$  no inhibe a las CFC del linaje mieloide mientras que sí lo hace con los progenitores eritroides. Cabe mencionar que el trabajo de Després fue desarrollado utilizando LMC virgen de tratamiento estimulada *in vitro* con IFN $\alpha$ , lo que hace una diferencia importante con los resultados de éste trabajo, debido a que las células CD34+LIN- se obtuvieron de muestras de pacientes tratados *in vivo* con el inhibidor.

Por otra parte cuando se usaron muestras de pacientes que recibieron trasplante de células hematopoyéticas, se observó que los potenciales de proliferación y expansión se incrementan, aunque en ninguno de los casos llegan a ser como los detectados en MON, lo que probablemente se deba al efecto de los regimenes de preparación al trasplante.

En relación a este punto, no existen datos en la literatura que expliquen el comportamiento *in-vitro* de células provenientes de LMC después del trasplante, pero si se conoce que en el caso de la Leucemia Mieloide Aguda los agentes quimioterapéuticos utilizados antes del trasplante tienen efectos negativos en la actividad biológica de las células hematopoyéticas; incluso estos efectos permanecen por periodos largos de tiempo y aún después de que la exposición a las drogas ha sido eliminada (Chang et al, 1990), además de que en estos casos existe una reducción en el numero de células CD34+ y LTC-IC (Kasper et al, 1999).

Según lo antes mencionado, es probable que este mismo efecto se presente en las células CD34+LIN- utilizadas en este trabajo, aunque no debe perderse de vista que en el caso de este padecimiento, la permanencia del cromosoma Philadelphia es un factor determinante en el comportamiento *in vitro* de las células progenitoras hematopoyéticas.

Un dato de gran relevancia en este trabajo, es el detectado en los potenciales de proliferación y expansión de las células CD34+LIN- de LMC que provenían de pacientes tratados con ST1571, ya que éstas células se comportan

de forma muy semejante a las de MON, especialmente cuando fueron cultivadas en presencia de la combinación de citocinas mixta.

A este respecto, se conoce que la administración de STI571 causa una recuperación a la hematopoyesis normal, en un periodo de 3 semanas después de que se ha iniciado el tratamiento, efecto que permanece durante el tiempo que dure la terapia (Druker y Lydon, 2000). El dato anterior, asociado a que todos los pacientes utilizados en este trabajo habían recibido tratamiento con STI571 durante 4 a 6 meses, sugiere que en las células utilizadas se ha recuperado la hematopoyesis normal, y que la proliferación que se detecta corresponde a la población residual normal presente en LMC.

No obstante, existen reportes en donde se menciona que el STI571 también es capaz de inhibir la proliferación y la capacidad formadora de colonias de células CD34+ provenientes de MON y Sangre de Cordón Umbilical, cuando son cultivadas en medio libre de suero y suplementadas con SCF (100 ng/ml), Flt3-L (100 ng/ml), TPO (50 ng/ml), IL-3, IL-6 y G-CSF (20 ng/ml) mas 5  $\mu$ M del inhibidor. Sin embargo, en estas mismas condiciones no se detecta efecto inhibitor en células formadoras de áreas coblestone, que corresponden a una población hematopoyética más primitiva (Bartolovic et al, 2004).

Así mismo Dewar y colaboradores (2003), reportaron que células CD34+ de MON son inhibidas en su proliferación, cuando se cultivaron en presencia de IL-3, IL-6, G-CSF, y M-CSF (10ng/ml) mas 3  $\mu$ M de STI571, el cual tiene un fuerte efecto inhibitor en la generación de progenitores monocito-macrófago.

Según estos reportes y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede sugerir que el hecho que las células CD34+LIN- provenientes de LMC no igualen la proliferación detectada en las células CD34+LIN- de MON puede ser debida a que el STI571 este inhibiendo la hematopoyesis normal, además de que pudiera ser necesaria una mayor concentración de citocinas como estímulo a la proliferación y expansión. Cabe resaltar que una diferencia relevante entre los reportes arriba mencionados y éste trabajo, es la población en la que se evaluó el efecto del STI571, así como la forma de administración, ya que mientras Bartolovic y Dewar trabajan con células CD34+ estimuladas *in vitro*, en

este trabajo se utilizó una población celular mas primitiva (CD34+LIN) y el estímulo se genero *in-vivo*, al suministrar la droga directamente a los pacientes.

Esta diferencia, también puede explicar el porqué en nuestras condiciones de trabajo no existe una disminución en la generación de colonias del linaje mieloide (ver tabla 12) tal y como lo describieron Dewar y otros (2003) así como Marley y colaboradores (2000), aunque éstos últimos realizaron la determinación utilizando CMN suplementadas con 1 ng/ml de GM-CSF, 100 ng/ml de G-CSF, 5 ng/ml de IL-3 y 20 ng/ml de SCF mas 10  $\mu$ M de STI571, lo que hace que su población de estudio sea aún más heterogénea que la que se utilizó en este trabajo.

Es importante recalcar que aunque la aplicación *in-vivo* de los diferentes agentes terapéuticos en LMC, modifican en menor o mayor grado la capacidad de proliferación y expansión de las células progenitoras hematopoyéticas CD34+LIN-, es posible que los potenciales observados sean también un reflejo de la cantidad de células Bcr-Abl positivas que permanecen en los pacientes al momento de tomar la muestra, y de la capacidad que estas tengan de permanecer en los cultivos después de recibir el estímulo con citocinas, por lo que la detección del rearreglo Bcr-Abl en estas células es de suma importancia para entender el comportamiento de estas subpoblaciones.

## 2.2 Detección de Bcr-Abl en la subpoblación CD34+LIN- de Leucemia Mieloide Crónica.

Con el objetivo de analizar a un nivel mas profundo el efecto de los diferentes tratamientos en la subpoblación CD34+LIN- de LCM, se decidió evaluar la expresión del transcrito para Bcr-Abl, en las diferentes muestras y a los diferentes días de cultivo.

Para ello, se hizo necesario analizar primero el nivel de detección mínimo para Bcr-Abl, lo que condujo a utilizar la línea celular K562, la cual proviene de una paciente con LMC en crisis blástica positiva al cromosoma Philadelphia.

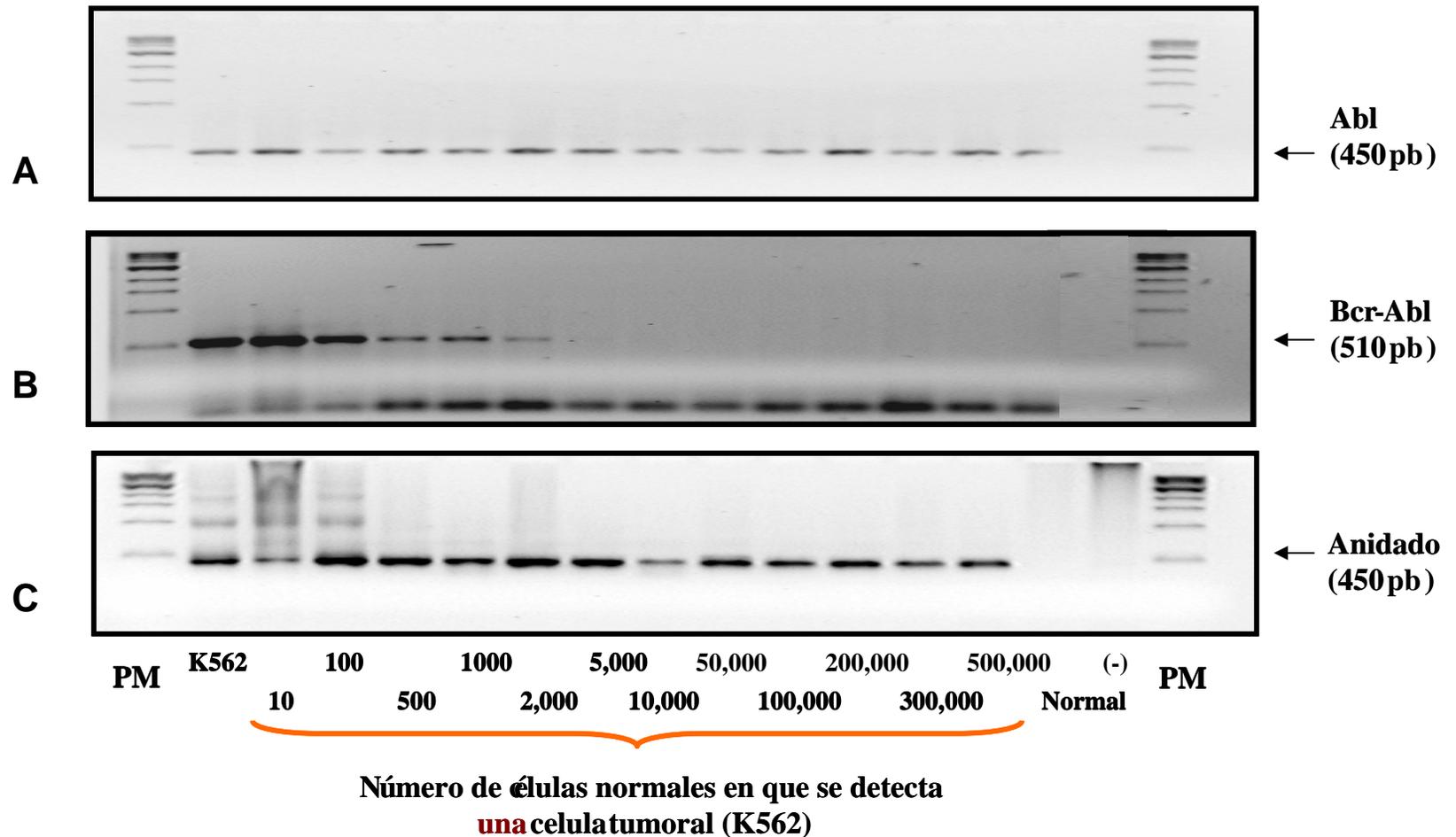
Una forma de establecer el nivel de detección mínima de Bcr-Abl, fue determinar en qué cantidad de células totales se puede detectar el rearreglo. Por esta razón se mezclaron células K562 con células normales provenientes de sangre periférica, de manera que se obtuvieran diluciones en las que hubiera una sola célula positiva para Bcr-Abl, en cantidades crecientes de células normales. A las diferentes diluciones se les extrajo el ARN y posteriormente se analizó mediante RT-PCR y PCR-Anidado la expresión de Abl y Bcr-Abl, respectivamente.

Como se observa en la **Figura 24A**, la banda de Abl (que por ser una molécula de expresión constitutiva en la célula, se utilizó como control interno), se expresa en las diferentes diluciones y controles, mientras que no se detecta en el control con agua, lo que indica que la síntesis de cDNA y la reacción de PCR, fueron realizadas de forma correcta en las diferentes muestras.

Cuando en una segunda reacción de PCR, se determinó la presencia de la translocación Bcr-Abl (**Figura 24B**), se encontró que la banda de 510 kb correspondiente a dicha translocación solo se detecta en el control positivo (células K562), así como en las 5 primeras diluciones (1/10-1/2000), en las que la intensidad de la banda que indica la expresión de Bcr-Abl, va disminuyendo.

Con base en el resultado anterior, y con la finalidad de incrementar la sensibilidad de la técnica, se planteó la necesidad de realizar un PCR anidado. Para ello, 2  $\mu$ l del producto de PCR de Bcr-Abl fue sometido a una segunda reacción de PCR en la que se utilizaron primers internos de la translocación Bcr-Abl.

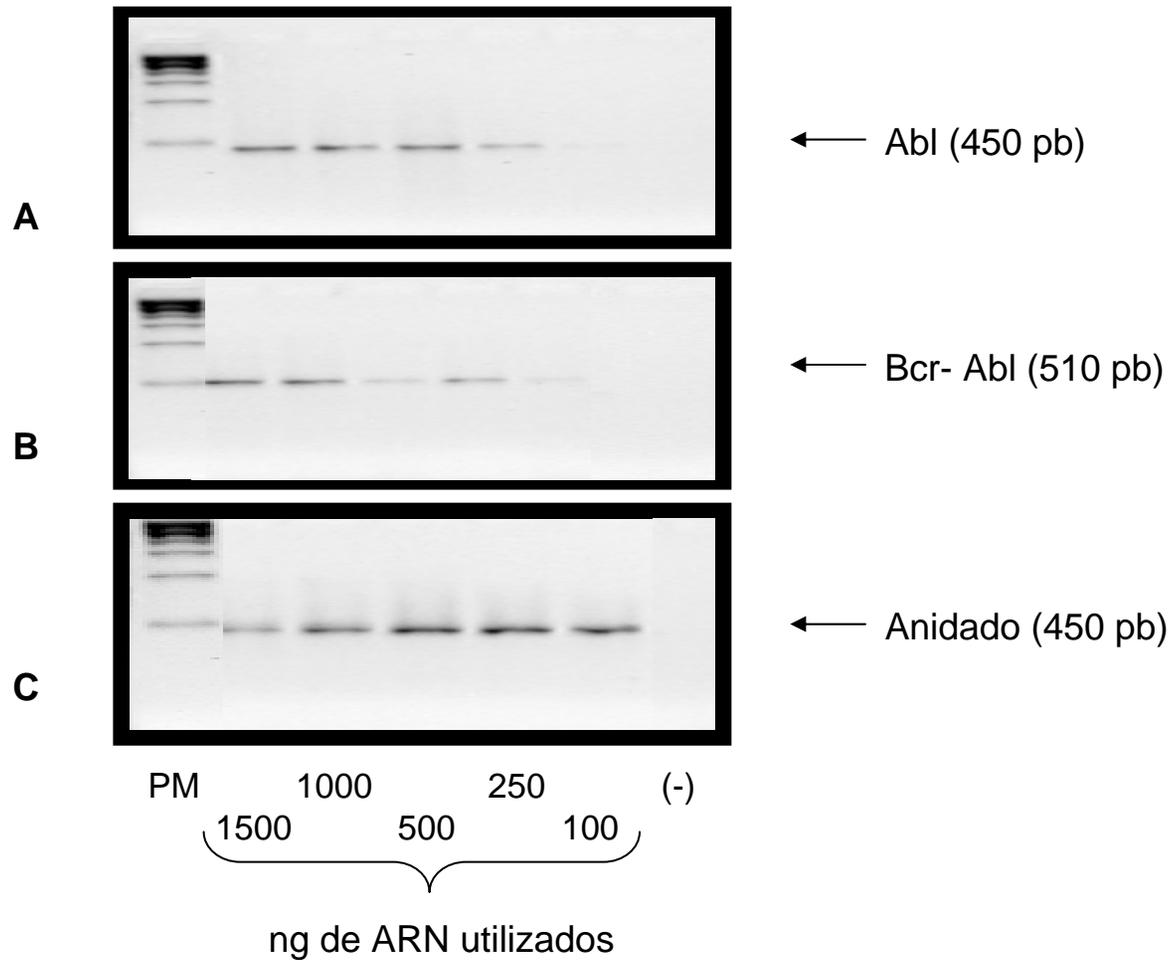
La **Figura 24C** demuestra que al realizar el PCR-Anidado, se puede detectar el transcrito para Bcr-Abl en todas las diluciones empleadas, así como en el control positivo, mientras que no se observa banda correspondiente a Bcr-Abl en el control normal y en el control con agua. Estos datos permiten afirmar que utilizando este sistema, se puede detectar desde 1 célula tumoral en 10 células normales, hasta 1 célula tumoral en 500,000 normales.



**Figura 24. Estandarización del número celular mínimo en que se puede detectar Bcr-Abl.** Una célula K562 fue mezclada con números celulares crecientes (10, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 50000, 100000, 200000, 300000 y 500000) de células normales para determinar mediante PCR, la presencia de Abl (A) y Bcr-Abl (B) o Bcr-Abl después de efectuar una segunda reacción de PCR (Anidado) (C). Marcadores de Peso Molecular (PM), control positivo para la translocación Bcr-Abl (K562), diferentes diluciones en las que se depositó una célula K562 (10, 100, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 50000, 100000, 200000, 300000 y 500000), Sangre Periférica Normal utilizada como control negativo de la translocación Bcr-Abl (Normal) y control de la técnica en la que se utilizó agua (-)

Por otra parte, debido a que ocasionalmente el número celular no era suficiente para evaluar la presencia de Bcr-Abl, también se determinó la cantidad de ARN que era necesaria como mínimo en la realización del ensayo. Para ello, se sintetizó cDNA a partir de concentraciones decrecientes (1500, 1000, 500, 250 y 100 ng) de ARN de la línea celular K562. Al cDNA obtenido, se le realizó PCR para evaluar la presencia de Abl y de Bcr-Abl y a este último también se le realizó un PCR anidado para incrementar el nivel de detección del rearrreglo.

La **Figura 25** indica que la molécula constitutiva Abl (450 pb) se presenta en las diluciones que van de 250 a 1500 ng de ARN, y su detección se pierde en la muestra que proviene de 100ng de ARN de la línea K562. En cuanto a la presencia de la banda para Bcr-Abl (510 pb), ésta se detecta en las cinco diferentes concentraciones de ARN, aunque su presencia es mínima en las muestras de 100 a 500 ng de ARN. Finalmente, después de utilizar el PCR anidado, la banda de Bcr-Abl (450 pb) se detecta en todas las concentraciones de ARN utilizadas, lo que indica que en nuestro sistema también se podía determinar la presencia de la translocación Bcr-Abl, a partir de hasta 100 ng de ARN.



**Figura 25. Estandarización de la concentración mínima necesaria de ARN para detectar Bcr-Abl.** Diferentes concentraciones (1500, 1000, 500, 250 y 100 ng) de ARN de la línea celular K562 fueron utilizados para determinar mediante PCR, la expresión de Abl (A), Bcr-Abl (B) o Bcr-Abl después de realizar una doble reacción de PCR (Anidado) (C). Marcadores de Peso Molecular (PM) y control de la técnica en la que se utilizó agua (-).

Una vez determinado el nivel de sensibilidad mínima en la técnica de detección para Bcr-Abl, se procedió a evaluar si las CMN y la subpoblación enriquecida en células CD34+LIN- que provenían de pacientes que habían sido tratados con diferentes regímenes terapéuticos, presentaban el rearrreglo al momento de su obtención. Por tal motivo el ARN de las muestras fue obtenido inmediatamente después de la selección inmunomagnética, y se utilizaron 1500 ng de éste para sintetizar el cDNA, mismo que se utilizó para la determinación de Abl (**Figura 26A**), y Bcr-Abl (**Figura 26B**). En todos los casos se realizó una reacción de PCR-Anidado, utilizando los productos de Bcr-Abl obtenidos en la primera reacción (**Figura 26C**).

Los resultados indican que, todas las muestras presentan el transcrito para Abl, y en el único sitio en donde no se presenta la banda es en el control del experimento, en donde se realizó la síntesis de cDNA y la reacción de PCR utilizando agua en lugar de ARN (**Figura 26A**).

En relación con la expresión de Bcr-Abl, se observa que después de haber realizado la primera reacción de PCR, la molécula no se detecta en las muestras que recibieron tratamiento con STI571 y con trasplante de células hematopoyéticas. Sin embargo, sí se detecta en las muestras que no han recibido ningún tratamiento, así como en las muestras que recibieron tratamiento con IFN $\alpha$  (**Figura 26B**).

El haber encontrado Bcr-Abl en el día cero de las muestras tratadas con IFN $\alpha$ , puede asociarse con el comportamiento registrado en la proliferación y la expansión antes descritas, e incluso podría justificar la alta semejanza que estas células presentaron con relación a las muestras vírgenes de tratamiento. Sin embargo, el hecho que los pacientes de donde estas muestras fueron obtenidas presenten recuperación hematológica, sugiere que aunque esté presente el transcrito para Bcr-Abl, éste puede no tener toda su capacidad transformante debido a alguno de los efectos provocados por el uso de IFN $\alpha$ .

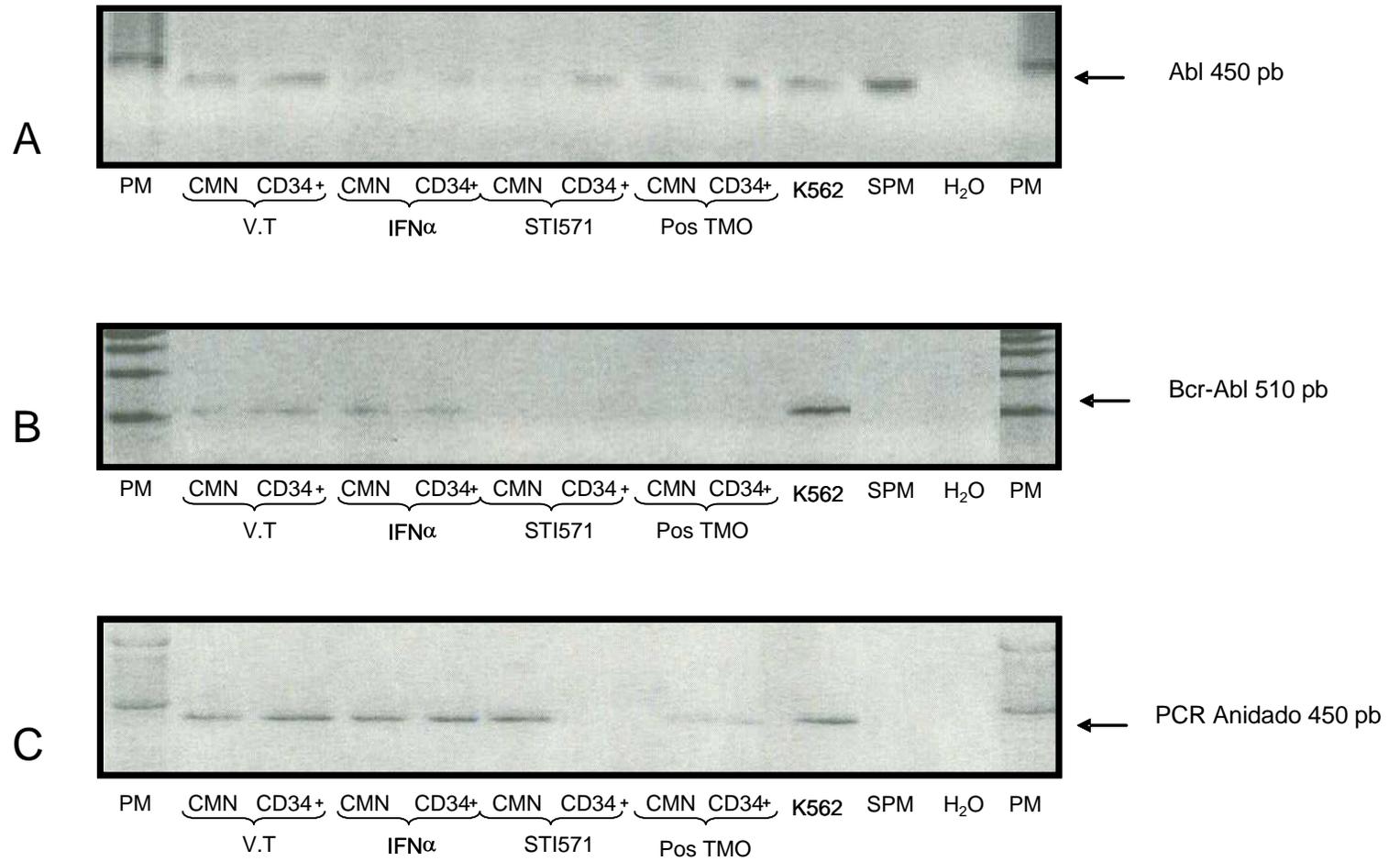
Por otra parte, cuando a las diferentes muestras se les realizó la segunda reacción de PCR (PCR-anidado), se encontró que el transcrito se presenta en todos los casos, excepto en la subpoblación CD34+LIN- que provenía de las

muestras tratadas con STI571, lo que también correlaciona con el comportamiento *in-vitro* de esta subpoblación, ya que como se observó en las Figuras 19-22, las células proliferan y se expanden de forma muy similar a las provenientes de MON.

Cabe mencionar que en el caso de las muestras tratadas con transplante de células hematopoyéticas, también se detecta el rearreglo Bcr-Abl, aunque su expresión parece ser menor que la detectada en las muestras tratadas con IFN $\alpha$  y vírgenes de tratamiento. Este dato podría también asociarse con la capacidad proliferativa y de expansión previamente descrita, ya que aunque las células CD34+LIN- provenientes de pacientes que recibieron TCH no llegan a comportarse como las células provenientes de MON, tampoco lo hacen como las tratadas con IFN $\alpha$ , que son muy similares a las vírgenes de tratamiento.

En este sentido, Sick y otros (2001), encontraron que CFC provenientes de pacientes con LMC tratados con IFN $\alpha$  en diferentes fases de la enfermedad eran positivos a Bcr-Abl, y que el número de colonias que presentaron el rearreglo era directamente proporcional a la fase de la enfermedad de donde provenían las células. Aunado a lo anterior, Chomel y colaboradores (2000) reportaron que leucocitos totales de pacientes con LMC tratados con IFN $\alpha$  o TCH, presentan el gen de fusión Bcr-Abl al evaluarlo mediante FISH, pero no detectó el transcrito al evaluarlo por medio de RT-PCR, por lo que el autor sugiere que la translocación se presenta en células progenitoras primitivas que pueden estar quiescentes y transcripcionalmente silentes, comentario que puede ser aplicado a las células CD34+LIN- utilizadas en este trabajo.

El resultado de la **Figura 26C**, también demostró que las células CD34+LIN- provenientes de pacientes tratados con STI571 no presentan el rearreglo Bcr-Abl. Sin embargo, hay autores que mencionan que en la subpoblación CD34+ el rearreglo permanece, a pesar del tratamiento con STI571 y factores de crecimiento (Graham. et al, 2002; Bhatia et al, 2003).



**Figura 26. Detección de Bcr-Abl en pacientes con LMC después de diferentes tratamientos.** Células Mononucleares y CD34+lin- obtenidas de muestras vírgenes de tratamiento (VT), tratadas con Interferón-alfa (IFN $\alpha$ ), tratadas con STI571 (STI571) y después de trasplante de Médula Ósea (Pos TMO), fueron utilizadas para evaluar la expresión de la molécula constitutiva Abl (A), y del rearreglo Bcr-Abl (B). En todos los casos se realizó un PCR anidado (C), para incrementar el nivel de detección. Las bandas obtenidas fueron comparadas con el control positivo (K562), el control negativo (SPM) y el control de la técnica (H<sub>2</sub>O). El peso de las bandas fue determinado de acuerdo con los marcadores de Peso Molecular (PM).

De acuerdo con los reportes anteriores y con la finalidad de determinar si en las diferentes muestras y condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo existía la permanencia del rearrreglo Bcr-Abl, se decidió tomar células que fueron estimuladas con la combinación de citocinas mixta a los 5, 10 y 15 días de cultivo, y se evaluó la presencia del rearrreglo Bcr-Abl, mediante PCR y PCR-Anidado.

Los datos de la **Tabla 14**, indican que en el caso de las células CD34+LIN- provenientes de muestras vírgenes de tratamiento, el rearrreglo Bcr-Abl esta presente durante los diferentes días de cultivo, lo mismo que en las células provenientes de pacientes tratados con IFN $\alpha$  y TCH, en donde además la presencia del rearrreglo es suficiente como para ser detectada desde la primera reacción de PCR. No obstante, ésto no sucedió en el caso de las células provenientes de pacientes tratados con STI571, ya que en la evaluación al día 5, el rearrreglo sólo se detectó después de realizar el PCR-anidado, lo que sugería que al inició del cultivo existía un bajo número de copias de la molécula, mismo que se recuperó en las evaluaciones al día 10 y 15 en donde la presencia de Bcr-Abl se detectó desde la primera reacción de PCR.

Estos datos además sugieren que en los pacientes tratados con STI571 nunca desaparece la clona maligna, y que al inicio de los cultivos su número celular es tan pequeño que no permite ser detectado por nuestro sistema. Sin embargo, conforme el tiempo de cultivo avanza, la presencia de las células positivas a Bcr-Abl se incrementa y es posible su detección.

En este sentido, Lange y colaboradores (2004) evaluaron la presencia de Bcr-Abl mediante PCR-Anidado en 14 pacientes que habían recibido TCH, y encontraron que después de 28 días en cultivo solo 6 pacientes eran negativos a la presencia de la translocación. Así mismo Janssen y otros (2000), sugirieron que las células progenitoras de LMC, al compararse con su contraparte normal son mas aptas para sobrevivir a las quimioterapias aplicadas previas al trasplante debido a la resistencia a la apoptosis causada por la presencia del gen Bcr-Abl, lo que finalmente resulta en una selección de progenitores Ph<sup>+</sup> que resurgen después del trasplante.

**Tabla 14.** Detección de Bcr-Abl en células CD34+LIN- de LMC cultivadas durante diferentes días en la combinación de citocinas mixta.

Tratamiento (número de muestras)	MP Día 5	MP Día 10	MP Día 15	Reacción de PCR en que se detectó el rearreglo
Virgen (n=2)	√	√	√	1ª reacción
	√	√	√	2ª reacción (anidado)
IFN $\alpha$ (n=7)	√	√	√	1ª reacción
	√	√	√	2ª reacción (anidado)
STI571 (n=8)	∅	√	√	1ª reacción
	√	√	√	2ª reacción (anidado)
TCH (n=3)	√	√	√	1ª reacción
	√	√	√	2ª reacción (anidado)

Un mínimo de 1500 ng de ARN fue utilizado para sintetizar cDNA y posteriormente evaluar la presencia (√) o ausencia (∅) de Bcr-Abl mediante PCR y PCR anidado.

En relación con las células provenientes de pacientes tratados con STI571, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por el grupo de Bathia (2003), quienes evaluaron mediante FISH la presencia de Bcr-Abl en CFC y LTC-IC de pacientes con LMC en remisión citogenética completa, y encontró que el STI571 no elimina los progenitores primitivos malignos en pacientes con LMC. Cabe mencionar que aunque el autor utiliza una población celular más heterogénea que la empleada en este trabajo, sus resultados reflejan el comportamiento de las células al ser tratadas *in-vivo* con el inhibidor.

Aunado a lo anterior Graham y colaboradores (2002), reportaron que células CD34+LIN- provenientes de pacientes con LMC y cultivadas en presencia de SCF, Flt-3, IL-3, IL-6 y G-CSF (100 ng/ml) mas 1  $\mu$ M de STI571 durante 12 días disminuyen su proliferación, aunque detectó que existe un subgrupo de células Ph+ que permanece insensible aún en presencia de la combinación de factores de crecimiento, por lo que sugiere que el STI571 solo elimina a las células que se encuentran en división.

Con relación a este último punto, es probable que en este trabajo aunque el rearreglo no se elimine, el STI571 inhiba la clona leucémica, por lo que las respuestas en proliferación y expansión observadas pudieran ser debidas a la población residual normal, que se sabe coexiste con la población leucémica.

En este sentido Holtz y otros (2002), describieron que 1  $\mu$ M de STI571, es capaz de restaurar la hematopoyesis normal al inhibir a progenitores leucémicos proliferativos sin eliminarlos, y aún a pesar de haber recibido estimulación con 200 pg/ml de GM-CSF, 200 pg/ml de SCF, 1 ng/ml de G-CSF, 1 ng/ml de Factor Inhibidor de Leucemia (LIF), 50 pg/ml de MIP-1 $\alpha$  y 200 pg/ml de IL-6. Además, dicha inhibición esta dada por la detención del ciclo celular, y no por un estímulo de apoptosis. Aunado a lo anterior, también se sabe que la inhibición de la proliferación inducida por STI571, no distingue entre células provenientes de fase crónica y crisis blástica (Gambacorti-Passerini et al, 2001).

Cabe mencionar, que actualmente se conoce que algunos progenitores leucémicos no son capaces de responder al efecto inducido por STI571, debido a la sobre-expresión de Bcr-Abl o de genes de resistencia a multidroga, a la incrementada actividad cinasa de Bcr-Abl, a la adquisición de mutaciones compensatorias en genes diferentes a Bcr-Abl, o incluso a alteraciones en su forma proteica (Mahon et al, 2000; Roumiantsev et al, 2002; Barthe et al, 2002), lo que hace necesario que en la subpoblación de células progenitoras utilizadas en este trabajo, se evalúe la actividad cinasa de Bcr-Abl en las mismas condiciones de cultivo.

Además, también sería conveniente determinar la presencia y actividad de Bcr-Abl en la subpoblación celular mas primitiva CD34+CD38-LIN-, que como ya se observó en el trabajo, presenta alteraciones numéricas y funcionales. Sin embargo hasta el momento, los números celulares que se obtienen son tan reducidos, que su análisis y descripción biológica sigue siendo motivo de interés en la investigación mundial.

## VIII. DISCUSION GENERAL

La (LMC) es una enfermedad hematológica, caracterizada por la presencia de la translocación 9:22, que resulta en un cromosoma 22 acortado, usualmente referido como cromosoma Ph. La consecuencia molecular de esta translocación es la generación del gen de fusión Bcr-Abl, que codifica a una proteína tirosina cinasa activada constitutivamente. Esta cinasa, es capaz de inducir leucemias en ratones y es esencial para causar actividad transformante en diversas líneas celulares.

Debido a que el cromosoma Philadelphia esta presente en los diferentes linajes hematopoyeticos maduros, en progenitores formadores de colonias, en células iniciadoras de cultivos a largo plazo, e incluso en células endoteliales de pacientes con LMC, se ha sugerido, que el origen de la LMC es una célula troncal hematopoyetica (Clarkson et al, 2003), y aunque existe abundante información sobre esta patología, no está totalmente descrito el comportamiento de subpoblaciones enriquecidas en células troncales hematopoyeticas. Por esta razón, y con el objeto de contribuir a entender la biología básica de la LMC, el objetivo de este trabajo fue caracterizar los potenciales proliferativos y de expansión de dos subpoblaciones hematopoyeticas: una enriquecida en células progenitoras CD34+LIN- y otra en células mas primitivas con inmunofenotipo CD34+CD38-LIN-.

Nuestros resultados indican que ambas subpoblaciones tienen anomalías numéricas y funcionales en relación con células provenientes de MON. Particularmente, en el caso de la subpoblación CD34+LIN- proveniente de muestras vírgenes de tratamiento, los resultados encontrados indican que las células tienen limitada capacidad de proliferación y expansión *in vitro*, a pesar de que provienen de una condición tumoral. Esto podría sugerir que las alteraciones detectadas están asociadas a la presencia y actividad de Bcr-Abl.

Cabe recordar que aunque Bcr-Abl es capaz de estimular diversas rutas de señalización mitogénica, existen posiciones encontradas en la literatura en cuanto

al efecto que esta molécula causa en la proliferación y expansión de células primitivas, ya que mientras diferentes autores (Cortes et al, 1997; Jonuleit et al, 1998; Era y Witte 2000; Moore, et al 1998), mencionan que células de LMC que presentan Bcr-Abl tienen incrementada su capacidad de proliferación y expansión *in vitro*, nosotros encontramos lo contrario, tal y como lo han reportado los grupos de Bathia y colaboradores (2000) así como Bedi y colaboradores (1994).

En los estudios antes mencionados, no necesariamente se trabajó bajo las mismas condiciones (subpoblación celular, concentración y combinación de citocinas) que se utilizaron en este trabajo, lo que puede explicar algunas de las diferencias encontradas.

Aunado a lo anterior, el haber encontrado que todas las muestras vírgenes de tratamiento fueron positivas al rearreglo Bcr-Abl (tanto a día cero como a los diferentes días de cultivo), indica que aunque las células provienen de una condición tumoral con alta capacidad proliferativa *in-vivo*, al ser cultivadas *in-vitro* no son capaces de responder a la estimulación con citocinas tal y como sucedió con la MON. Este comportamiento sugiere que *in vivo*, la presencia de Bcr-Abl hace a las células progenitoras leucémicas particularmente susceptibles a los efectos de citocinas y aunque aparentemente sus requerimientos son menores (debido a que pueden sobrevivir de forma autocrina), las interacciones entre ellas, pueden causar la activación de progenitores quiescentes y conducir al incremento en la proliferación *in vivo*. No obstante, en este trabajo, no se han encontrado las condiciones de cultivo *in-vitro* para igualar la proliferación y expansión descrita *in vivo*, probablemente debido a que falte algún estímulo inductor que pudiera estar dado por la interacción de las células seminales y/o progenitoras con el microambiente hematopoyético.

Un claro ejemplo de este punto, es el efecto observado en las células CD34+LIN- que provenían de pacientes tratados con IFN $\alpha$ , las cuales no son capaces de mejorar sustancialmente sus capacidades de proliferación y expansión después de que son estimuladas con citocinas *in vitro* (e incluso se comportan de forma muy parecida a las muestras de LMC que no han recibido tratamiento), a pesar de que los pacientes se encontraban en remisión hematológica completa y

respuesta citogenética mayor, lo que hubiera sugerido que sus potenciales *in vitro* serían muy parecidos a los de MON.

Este hecho, aunado a que en las diferentes muestras pre-tratadas con IFN $\alpha$  se detectó la presencia de Bcr-Abl (desde el día cero y a los diferentes días de cultivo), sugiere que *in vivo* existe un mecanismo que evita que la clona leucémica prolifere, al tiempo que se favorece la hematopoyesis normal, motivo por el cual los pacientes se comportan como sujetos sanos, aunque hematopoyeticamente presenten importantes deficiencias. Sin embargo *in-vitro*, la expresión constante de Bcr-Abl podría ocasionar la limitada proliferación y expansión celular, que incluso podría estar dada por un mínimo número de células normales, que también son inhibidas por el efecto del IFN $\alpha$ .

Se ha descrito que el IFN $\alpha$  es capaz de suprimir la proliferación de células CD34+ mediante la utilización de su propio receptor (Ito et al, 2004) así como de inhibir la proliferación de LTC-IC provenientes de LMC (Cornelissen et al, 1998). Dichos efectos pueden lograrse debido a que ésta citocina es capaz de inducir un estado de quiescencia tumoral, así como incrementar la expresión de moléculas de adhesión que favorecen el contacto de células progenitoras con el estroma (Martín-Henao et al, 2000), por lo que en el caso particular de las células CD34+LIN- utilizadas en éste trabajo, sería conveniente determinar cual sería su respuesta proliferativa y de expansión al cultivarse en presencia de capas de células estromales (que simulen la interacción con su microambiente).

Dicha evaluación permitiría conocer si la presencia o carencia de contacto estromal y en consecuencia la expresión de ciertos reguladores de adhesión están directamente relacionados con la falta de proliferación y expansión encontrada en los cultivos líquidos utilizados en este trabajo, aunque debe recordarse que las células CD34+LIN- de MON estuvieron sujetas a las mismas condiciones de cultivo, lo que implica que en el caso de las células provenientes de muestras tratadas con IFN $\alpha$ , existe un defecto intrínseco y que posiblemente *in-vivo* las células se vean estimuladas con otros agentes que las obliguen a tener un comportamiento hematológicamente normal.

Las células CD34+LIN- que se obtuvieron de pacientes que recibieron TCH también presentaron potenciales de proliferaron y de expansión limitados, a pesar de que provenían de pacientes que se encontraban en remisión hematológica completa y respuesta citogenética mayor.

Cabe mencionar que la respuesta proliferativa y de expansión que se detectó en éstas células, fue mayor a la observada con las células tratadas con IFN $\alpha$ , hecho que puede asociarse con nivel de expresión de Bcr-Abl ya que como los resultados lo indicaron, en las células que habían sido tratadas con TCH el rearrreglo Bcr-Abl se detectó solo después de haber realizado el PCR-Anidado, mientras que en las células que habían recibido tratamiento con IFN $\alpha$  el rearrreglo se detectó desde la primera reacción de PCR, lo que sugiere que la expresión de Bcr-Abl en éstas últimas era mayor.

Reportes en la literatura indican que pacientes con LMC que han recibido trasplante de células hematopoyéticas, alcanzan una sobrevida libre de enfermedad entre el 60 y 80% a diez años (Savage y Goldman, 1997). De estos pacientes, la mayoría permanecen negativos a Bcr-Abl (determinado por medio de FISH y PCR) durante varios años, por lo que pueden llegar a considerarse como sujetos completamente sanos. No obstante, también existen pacientes en quienes se detecta un bajo nivel del transcrito, y que permanecen en remisión clínica durante varios años, e incluso se ha sugerido que la persistencia de la translocación puede ser producida por un limitado número de células troncales Ph+ que son incapaces de dividirse pero capaces de inducir nuevamente la enfermedad (Miyamura et al, 1993; Radich et al, 1995). Este último dato podría extrapolarse a las muestras utilizadas aquí, ya que como se mencionó anteriormente los pacientes se comportaban como sujetos sanos, aunque hematopoyéticamente tengan un comportamiento anormal.

Los datos antes mencionados dejan en claro que en algunos pacientes con LMC, existe un pequeño grupo de células progenitoras Ph+ que permanecen después del trasplante. Además, dichas células tienen la capacidad de incrementarse *in-vitro* cuando reciben un estímulo constante de citocinas.

A este respecto, Holyoake y colaboradores (2002) han mencionado que una pequeña población de células progenitoras de LMC permanecen quiescentes *in vivo*, pero después de varios días de estimulación *in vitro* son capaces de revertir la quiescencia y transitar a los siguientes estadios de maduración, evento que se acompaña de una rápida proliferación y expansión de la clona leucémica.

Este último punto, apoya lo sugerido por Clarkson y su grupo (2003), quienes mencionan de que la sola presencia de Bcr-Abl no es suficiente para inducir actividad transformante, aunque si puede condicionar de forma positiva o negativa (según los estímulos presentes en el microambiente) el comportamiento celular, ya que puede conducir a la dormancia tumoral o a la incrementada proliferación; ambos comportamientos observados *in vivo*.

Bajo esta premisa, y recordando que Bcr-Abl tiene actividad tirosina cinasa constitutiva, se diseñó el Inhibidor de la Transducción de Señales 571 (STI571), un inhibidor competitivo del sitio de unión a ATP de Bcr-Abl. Este inhibidor ha sido probado en una amplia gama de líneas celulares que expresan Bcr-Abl, o células derivadas de pacientes con LMC en crisis blástica, demostrando que es capaz de inhibir su proliferación cuando se usa en un rango de 0.25 a 0.5 $\mu$ M. Aunado a ello, 10 $\mu$ M de STI571 ha sido capaz de inhibir la formación de colonias provenientes de CMN, así como LTC-IC de pacientes con LMC (Druker et al, 1996; Deininger y Druker, 2003).

En este sentido, los resultados presentados en este trabajo contrastan con lo arriba descrito, ya que las células progenitoras hematopoyéticas (CD34+LIN-) utilizadas aquí no redujeron su capacidad de proliferar y expandirse, después de que recibieron tratamiento con STI571 y al contrario presentaron potenciales de proliferación y expansión muy semejantes a las células CD34+LIN- provenientes de MON. Una importante diferencia de este trabajo con los reportados en la literatura es la forma en que las células recibieron el estímulo con STI571, ya que mientras en los diferentes reportes el estímulo se recibió cuando las células se encontraban en cultivos *in-vitro*; en este trabajo, el estímulo se aplicó *in-vivo* y solo se evaluó el efecto de las diferentes combinaciones de citocinas en la capacidad de proliferación y expansión *in-vitro*, lo que podría sugerir que los datos aquí

encontrados son más semejantes al comportamiento real de las células progenitoras hematopoyéticas.

Debe recalarse que aunque las células tratadas con STI571 proliferaron y se expandieron de forma muy parecida a las muestras provenientes de MON, y aunque el transcrito para Bcr-Abl no fue detectado en el día cero del cultivo, las células se mostraron positivas para el rearreglo a lo largo de los diferentes días de cultivo, lo que indica que en los cultivos siempre existió una población positiva para Bcr-Abl, solo que en el día cero sus números eran muy bajos (menores a 1 célula tumoral por cada 500,000 células normales –según el límite mínimo de detección-) para ser detectados por nuestro sistema. Sin embargo, conforme el tiempo de cultivo avanzó la población Ph+ se incrementó y permitió su detección a partir del día 5 de cultivo.

Estos últimos datos podrían correlacionarse con lo reportado en la literatura, en donde se menciona que el rearreglo Bcr-Abl puede permanecer en pacientes que han obtenido respuestas citogenéticas completas (Bahtia et al, 2003) e incluso que existe una población de LMC altamente quiescente capaz de generar leucemia al ser trasplantada en ratones inmunodeficientes (Holyoake et al, 1999).

Los resultados de este trabajo sugieren entonces, que la población celular que prolifera y se expande de forma semejante a la MON es principalmente la población residual normal, mientras que las células de LMC (que evidentemente se encuentran en los cultivos) proliferan en un menor grado. Aunque también existe la posibilidad de que la actividad tirosina cinasa de Bcr-Abl se encuentre bloqueada por el efecto del STI571, y a pesar de que el número de células Ph+ se incrementa (y permita la detección del transcrito), dichas células no tienen la posibilidad de modificar el efecto en la proliferación y expansión.

Es importante recordar que si bien es cierto el STI571 también induce inhibición de la proliferación de células CD34+ normales, (Bartolovik et al, 2004), su efecto es claramente menor al detectado en LMC. Además el efecto de dicho inhibidor en la subpoblación CD34+LIN- no ha sido descrito. Este dato, aunado a que se ha descrito que las células formadoras de áreas coblestone no son inhibidas por STI571, sugiere que muy probablemente en la subpoblación

hematopoyetica CD34+LIN- se encuentre contenida una buena cantidad de células hematopoyeticas normales, y que incluso éstas pudieran encontrarse con mas frecuencia en una subpoblación hematopoyetica más primitiva. Dicha subpoblación podría corresponder a células con inmunofenotipo CD34+CD38-LIN- la cual ha sido descrita como una población altamente quiescente, y aunque en el caso de LMC favorece la dormancia tumoral, también es capaz de proliferar de forma autónoma, gracias a sus mecanismos de estimulación autócrina (Holyoake et al, 2002).

Aunado a ello, Petzer y Gunsilius (1997), publicaron que cultivos de LTC-IC iniciados con células CD34+CD38- provenientes de LMC, presentan altos niveles de células Ph- capaces de coexistir con células Ph+, las cuales al ser estimuladas con altas concentraciones de citocinas (100 ng/ml de Flt3-L; 100 ng/ml de SCF; 20 ng/ml de IL-3; 20 ng/ml de IL-6 y 20 ng/ml de G-CSF) muestran la misma dependencia a factores de crecimiento que su contraparte normal, aunque después de 10 días tienden a desaparecer de los cultivos, por lo que propone que las células seminales leucémicas están caracterizadas por una disminuida capacidad de proliferación y una incrementada capacidad de diferenciación.

Este último punto correlaciona con los resultados encontrados en este trabajo, en donde se detectó que la subpoblación de células primitivas CD34+CD38-LIN-, tiene disminuida su capacidad de proliferación y expansión en respuesta a diferentes combinaciones de citocinas. Así mismo, podría esperarse que en estos cultivos se encontrara enriquecida la población residual normal (Ph-), a la que se refirió Petzer, y de forma semejante puede ser que el bajo número de células Ph+ sean las que inicialmente responden al estímulo con citocinas, y después de cierto tiempo en cultivo ésta subpoblación comience a agotarse, al tiempo que las células Ph- (que permanecerían por mas tiempo en estado quiescente) comiencen a responder al estímulo con citocinas.

En este sentido, sería de gran importancia evaluar la respuesta de la subpoblación CD34+CD38-LIN- proveniente de pacientes que han recibido tratamiento *in-vivo* con diferentes agentes, esperando que particularmente en células tratadas con STI571, el comportamiento proliferativo y de expansión sea

muy parecido al observado en las células de MON, y con la probabilidad de que a lo largo de los diferentes días de cultivo ya no sean detectadas células Bcr-Abl positivas y solo se detecte la subpoblación residual normal, lo que sería de gran importancia como un método de purga biológica que permita su utilización en el tratamiento autólogo de pacientes con LMC.

## IX. CONCLUSIONES

En este trabajo, se ha podido determinar que poblaciones celulares enriquecidas en células troncales (CD34+CD38-LIN-) y células progenitoras (CD34+LIN-) hematopoyéticas, provenientes de pacientes con diagnóstico reciente de LMC tienen severas alteraciones en sus capacidades de proliferar y expandirse *in-vitro*, cuando son cultivadas en presencia de diferentes combinaciones de citocinas estimuladoras de la proliferación. Cabe hacer notar, que dichas alteraciones son mucho más evidentes en la subpoblación de células troncales que incluso mostraron menor capacidad de responder a la inhibición de la proliferación inducida por el TNF $\alpha$  que las células progenitoras CD34+LIN-. Estos datos son confirmatorios a lo descrito por otros autores en relación con la subpoblación CD34+LIN-, pero describen por primera vez que las alteraciones en la proliferación y expansión, también se registran en una subpoblación enriquecida de células altamente primitivas provenientes de pacientes con LMC que no han recibido tratamiento previo.

Aunado a ello, cuando se analizó el comportamiento *in-vitro* de células progenitoras provenientes de pacientes previamente tratados con IFN $\alpha$ , TCH o STI571, se encontró que mientras el IFN $\alpha$  no es capaz de inducir un incremento en la proliferación y expansión de las células progenitoras, el TCH y el STI571 si lo provocan e incluso en el caso de muestras de pacientes tratados con STI571, se registra una proliferación y expansión semejante a la de las células progenitoras provenientes de MON. Cuando se correlacionó este comportamiento *in-vitro* con la expresión del rearrreglo Bcr-Abl, se encontró que tanto en las células progenitoras provenientes de pacientes tratados con IFN $\alpha$  como en los tratados con TCH el rearrreglo está presente desde los primeros días de cultivo, lo que no sucede con las células progenitoras provenientes de pacientes tratados con STI571, en donde Bcr-Abl es imperceptible en los primeros días de cultivo, aunque su expresión aumenta conforme avanza el tiempo de cultivo.

Los resultados antes descritos son de suma importancia, ya que aunque la LMC y su asociación con Bcr-Abl han sido ampliamente descritas en la literatura, este es el primer trabajo en que se analiza y reporta el comportamiento *in-vitro*, de células progenitoras leucémicas obtenidas de pacientes que habían recibido algún tipo de tratamiento y su relación con Bcr-Abl.

Es importante hacer notar que el hecho de haber encontrado la translocación en todas las muestras, independientemente del tratamiento recibido indica que ninguno de ellos es capaz de erradicar la clona maligna y por lo tanto son hematopoyeticamente anormales, aunque los pacientes se comportaron como hematológicamente sanos.

## **X. PERSPECTIVAS**

Los resultados descritos en este trabajo así como los reportados en la literatura, representan un avance en el conocimiento de la hematopoyesis de la Leucemia Mieloide Crónica, y si bien reafirman que este padecimiento es uno de los mejores descritos en la literatura, también dejan claro que representa un ente altamente complejo, que para su entendimiento requiere la respuesta a una serie de nuevas interrogantes.

Por ello, y de acuerdo con los resultados aquí obtenidos, se plantea la necesidad de evaluar si la disminución de la proliferación y expansión observada en las muestras vírgenes de tratamiento, es debida a que existen alteraciones en los mecanismos que les permite detectar la estimulación con citocinas, por lo que el análisis de expresión de receptores (por lo menos para las citocinas utilizadas en este trabajo), así como el estado de activación de los mismos sería de gran utilidad en el entendimiento de la respuesta de células seminales y progenitoras hematopoyéticas a estímulos exógenos.

Otra interrogante que plantea este trabajo, es conocer porqué los pacientes tratados con Interferón alfa y Trasplante de Células Hematopoyéticas no recuperan sus potenciales de proliferación y expansión. Esta cuestión sugiere la participación del componente estromal en la repuesta hematopoyetica, por lo que conocer la interrelación entre ambos componentes (hematopoyetico y estromal) en la recuperación hematopoyetica, e incluso el efecto de ambos agentes terapéuticos en el comportamiento de ambas subpoblaciones hematopoyéticas normales, sería de utilidad para entender y mejorar ambas opciones terapéuticas.

Aunado a lo anterior, y con el antecedente que la subpoblación CD34+LIN- presenta la translocación Bcr-Abl, se ha considerado de suma importancia evaluar el estado de activación del producto proteico Bcr-Abl en las diferentes subpoblaciones hematopoyéticas, ya que si bien su presencia fue determinada mediante RT-PCR y PCR-Anidado, es posible que específicamente en las células

provenientes de pacientes tratados con STI571, la proteína se encuentre en un estado cinasa inactivo, que permita a las células proliferar y expandirse de forma semejante a las células normales, aunque no se haya perdido la expresión de Bcr-Abl. Así mismo sería relevante continuar con el estudio del comportamiento *in-vitro* de las subpoblación de células troncales CD34+CD38-LIN-, sólo que ahora podría ser abordada la relación entre las diferentes opciones terapéuticas y la expresión de Bcr-Abl, esperando que sea en esta subpoblación (y específicamente en células de pacientes tratados con STI571) en donde se encuentre la población residual normal descrita para el padecimiento.

El encontrar la población normal, abre la posibilidad de generar un sistema de cultivo *in-vitro*, que pueda emplearse como un método de purga biológica, en donde se pueda expandir *in-vitro* a la población normal para posteriormente aplicarse en los pacientes como una alternativa terapéutica de trasplante autólogo.

## LITERATURA CITADA

- Aggarwal, B; khor, W; Hass, B; Spencer, S; Henzel, W; Bringman, T; Nedwin, G; Goeddel, D; R, Harkins. (1985). Human tumor necrosis factors: production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 260: 2345-2354
- Aggarwal, B; Samanta, A; M. Feldmann. TNF $\alpha$ . *Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense.* Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.
- Altmann, W; Patel, N; R. Kastelein. (1995). Involvement of the fourth alpha-helix of mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in binding to the alpha subunit of the receptor complex. *Growth Factors.* 12: 251-262.
- Amarante Mendes G; Naekkyung, K; Liu, L; Huang, Y; Perkins, C; Green, D; K, Bhalla. (1998). Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood.* 91: 1700-1705.
- Anafi, M; Gazit, A; Zehavi, A; Neriah, B; A. Levitzki. (1993). Tyrphostin-induced inhibition of p210 bcr-abl tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate. *Blood.* 82: 3524-3529.
- Anderson, D.M; Kyman, S.D; Baid, A; Wignall, J. Eisenman, J; Rauch, C; March, C; Boswel, H. Gimpel, S; D. Cosman. (1990). Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell.* 63:235-243.
- Astaldi, G; Janssen, M; Lansdorp, P; Willems, C; Zeijlemaker, W; F. Oosterhof. (1980). Human endothelial culture supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas. *J. Immunol.* 125: 1411-1414.
- Bahtia, R; Hotlz, M; Niu, N; Gray, R; Snyder, D; Sawyers, C; Arber, A; Slovak, M; S. Forman. (2003). Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete

- cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood*. 101: 4701-4707.
- Baines, P; Mayani, H; Rains, M; Fisher, J; Hoy, T; A. Jacobs. (1988). Enrichment of CD34-positive myeloid and erythroid progenitors from human marrow and their growth in cultures supplemented with rhGM-CSF. *Exp Hematol*. 16: 785-189.
  - Barthe, C; Gharbi, M; Lagarde, V; Chollet, C; Cony-Makhoul, P; Reiffers, J; Goldman, J; Melo, J; F. Mahon. (2002). Mutation in the ATP-binding site of BCR-ABL in a patient with chronic myeloid leukaemia with increasing resistance to STI571. *Br. J Haematol*. 119: 109-111.
  - Bartolovik, K., Balabanov, S; Hartman, U; Komor, M; Boehmier, A; Bühring, H; Möhle, R; Hoelzer, D, Kans, L; Hoffman, W; T. Brümmendorf. (2004). Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells *in vitro*. *Blood*. 103: 523-529.
  - Beagley, K; Eldirdge, J; Lee, F; Kiyoni, H; Everson, M; Koopman, W; Hirano, T; Kishimoto, T; J. McGhee. (1989). Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J. Exp. Med*. 169: 2133-2148.
  - Becker, A.J; McCulloch, E.A; E.J. Till. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from mouse marrow cells. *Nature*. 197: 452- 454
  - Bedi, A; Zehnbaauer, B; Barber, J; Sharkis, S; R, Jhones. (1994). Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 83:2038-2044.
  - Belluci, R; Sala, R; De Porpris, M; Cordone, I; P De Fabritiis. (1999). Interferon-alpha and bcr-abl antisense oligodeoxynucleotides in combination enhance the antileukemic effect and the adherence of CML progenitors to preformed stroma. *Leuk. Lymphoma*. 35: 471-481.
  - Benjamin, M; Chandra, J; Svingen, P, Hallgren, C; Weisber, E; Koltke, T; Narayanan, M; Sausville, E; S. Kaufmann. (2002). Effects of the Bcr/abl kinase inhibitors STI571 and adaphostin (NSC680410 on CML cells *in vitro*. *Blood*. 99:664-671.

- Beran, M; O'Brien, S; Andersson, B; McCredie, K; J. Gutterman. (1988). Tumor necrosis factor and human Hematopoiesis: II . Inhibition and mode of action on normal and chronic myelogenous leukemia-derived granulocyte-macrophage progenitor cells. *Hematol Pathol.* 2: 65-71.
- Bhatia, M; Bonnet, D; Murdoch, B; Gan, O; J. Dick. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat. Med.* 4:1038-1045
- Bhatia R; Muthe, H; Williams, A; Zhang, F; Forman, S; M. Slovak. (2000). Chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors demonstrate increased sensitivity to growth factor-induced proliferation and maturation. *Exp. Hematol.* 115:845-853.
- Bhatia, R; Holtz, M; Niu, N; Gray, R; Snyder, D; Sawyers, C; Arber, D; Slovak, M; S. Forman. (2003). Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood.* 101: 4701-4707.
- Biernaux, C; Sels, A; Huez, G; P. Stryckmans. (1996). Very low level of major BCR-ABL expression in blood of some healthy individuals. *Bone Marrow Transplant.* 17 (Suppl 3): S45-S47.
- Bonnet, D. (2002). Haematopoietic stem cells. *Journal of Pathology.* 197: 430-440
- Brasel, K; Mc Kenna, H; Morrissey, P; Carrier, K; Morris, A. Lee, C; Williams, D; SD, Lyman. (1996). Hematologic effects of flt3-L in vivo in mice. *Blood.* 88:2004-2012.
- Brasel, K; Escobar, S; Anderberg, R; de Vries, P; Gruss, H; and SD. Lyman. (1995). Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia.* 9: 1212-1218.
- Bubnoff, N; Peschel, C; J. Duyster. (2003). Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Gleevec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia.* 17:829-838.
- Calabretta, B; D. Perrotti. (2004). The biology of CML blast crisis. *Blood.* 103: 4010-4022.

- Carroll, M; Ohno-Jhones, S; Tamura, S. (1997). CGP57148 a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, REL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood*. 90:4947-4952.
- Caux, C; Saeland, S; Favre, C; Duvert, V; Mannoni, P; J. Banchereau. (1990). Tumor necrosis factor alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 75: 2292-2298.
- Chabannon, D; B. Torok-Storb. (1992). Stem Cell-Stromal Cell Interactions. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 177: 123-136.
- Chalandon, Y; Jiang, X; Hazlewood, G; Loutet, S; Conneally, E; Eaves, A; C. Eaves. (2002). Modulation of activity in p210BCR-ABL transduced in primary human hematopoietic cells controls lineage programming. *Blood*. 99: 3197-3204.
- Chang, J; Geary, C; N. Testa. (1990). Long-term bone marrow damage after chemotherapy for acute myeloid leukaemia does not improve with time. *Br. J. Haematol*. 75: 68-72.
- Chase, A; Huntli, B; N. Cross. (2001). Cytogenetics of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 14: 553-571.
- **Chen, C; Uchida, H; Miyakawa, Y; Ikeda, Y; M, Kizaki. (2002). Induction of apoptosis by cooperative interaction of ICSBP and PU.1 on the regulation of bcl-2 gene expression in interferon- $\alpha$ -treated CML cells. *Blood*. 100: 582a**
- Chomel, J; Brizard, F; Veinstein, A; Rivet, J; Sadoun, A; Kitzis, A; Guilhot, F; A. Brizard. (2000). Persistence of BCR-ABL genomic rearrangement in chronic myeloid leukemia patients in complete and sustained cytogenetic remission after interferon- $\alpha$  therapy or allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 95: 404-409.
- Civin, C.I; Strauss, L:C; Browal, C (1985). Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody against KG1a cells. *J. Immunol*. 133: 157-164.

- Clarkson, B; Strife, A; Wisniewski, D; Lambek, C; C. Liu. (2003). Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*. 17: 1211-1262.
- Cohen, A; Zesbo, K; Inoue, H; Hines, D; Bone, T; Chazin, V; Tsai, L; Ritch, T. L. Souza. (1987). In vivo stimulation of granulopoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 2484-2488.
- Cornelissen, J; Ploemacher, R; Wognum, B; Borsboom, A; Kluin-Nelemans, H; Hagemeijer, A; B, Lowenberg. (1998). An in vitro model for cytogenetic conversion in CML. Interferon-alpha preferentially inhibits the outgrowth of malignant stem cells preserved in long-term culture. *J. Clin. Invest.* 102: 976-983.
- Cortez, D; Reuther, G; A. Pendergast. (1997). The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1 to S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene*. 15: 2333-2342.
- Coulombel, L; Kalousek, D; Eaves, C; Gupta, C; A. Eaves. (1983), Long-Term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 308: 1493-1498.
- Cross, N; A. Reiter. (2002). Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 16: 1207-1212.
- Dash, A; Williams, I; Kutok, J; Tomasson, M; Anastasiadou, E; Lindahi, K; Li, S; Van-Etten, R; Borrow, J; Housman, D; Druker, B; G. Gilliland. (2002). A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *PNAS*. 99: 7622-7627.
- Deininger, M; B. Druker. (2003). Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib. *Pharmacol. Rev.* 55:401-423.
- Deininger, M; Bose, S; Gora-Tybor, J; Yan, X; Goldman, J; J. Melo. (1998). Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res.* 58: 421-425.
- Deininger, M; Goldman, J; J. Melo. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 96: 3343-3356.

- Deininger, M; Vieira, S; Mendiola, R; Schultheis, B; Goldman, J; J. Melo. (2000). BCR-ABL Tyrosine Kinase Activity Regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Research*. 60: 2049-2055.
- Delgado, D; Vaque, P; Arozarena, I; López-Illasca, M; Martínez, C; Crespo, P; J. León. (2000). H- K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21-dependent mechanism. *Oncogene*. 19: 783-790.
- Després, D; Goldschmitt, J; Aulitzky, W; Huber, C; C, Peschel. (1995). Differential effect of type I interferons on hematopoietic progenitor cells: Failure of interferons to inhibit IL-3-stimulated normal and CML myeloid progenitors. *Exp Hematol*. 23:1431-1438.
- Dewar, A; Domaschensz, R; Doherty, K; Hughes, T; A. Lyons. (2003). Imatinib inhibits the *in vitro* development of the monocyte/macrophage lineage from normal human bone marrow progenitors. *Leukemia*. 17:1713-1721.
- DiBacco, A; T. Cotter. (2002). P53 expression in K562 cells is associated with caspase-mediated cleavage of c-ABL and BCR-ABL protein kinases. *Br. J. of Haemat*. 117: 588-597.
- Diekmann, D; Brill, S; M. Garrett. (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21 rac. *Nature*. 351: 400-402.
- Dorshkind, K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Ann. Rev. Immunol*. 8: 111-137.
- Dowding, C; Gordon, M; Guo, A; Maison, D; Osterholz, J; Siezkowski, M, J. Goldman. (1993). Potential mechanisms of action of interferon-alpha in CML. *Leuk. Lymphoma*. 11. (Suppl. 1): 185-91.
- Druker, B. (2001). Signal Transduction Inhibition: Results from Phase I Clinical Trials in Chronic Myeloid Leukemia. *Seminars in Hematology*. 38. Suppl 8: 9-14.
- Druker, B; N. Lydon. (2000). Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 105: 3-7.
- Druker, B; Tamura, S; Buchdunger, E; Ohno, S; Segal, G; Fanning, S; Zimmermann, J; N. Lydon. (1996). Effects of a selective inhibitor of the

- Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2: 561-566.
- Duncombe, A; Heslop, H; Turner, M; Meager, A; Priest, R; Exlev, R; M. Brenner. (1989). Tumor necrosis factor mediates autocrine growth inhibition in a chronic leukemia. *J. Immunol.* 143: 3828-3834.
  - Dybedal, I; Brider, D; Fossum, A; Rustre, L; S. Jacobsen. (2001). Tumor necrosis factor-mediated activation of the p55 TNF receptor negatively regulates maintenance of cycling reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood.* 98: 1782-1791.
  - Eisterer, W; Jiang, X; Christ, O; Glimm, H; Lee, K; Pang, E; Lambie, K; Shaw, G; Holyoake, T; Petzer, A; Auewarakul, C; Barnett, M; Eaves, C; A. Eaves. (2005). Different subsets of primary chronic myeloid leukemia stem cells engraft immunodeficient mice and produce a model of the human disease. *Leukemia.* 19: 435-441.
  - Engelhardt, M; Lubbert, M; Y. Guo. (2002). CD34+ or CD34-: which is the more primitive?. *Leukemia.* 16: 1603-1608.
  - Epstein, F. (1999). The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal Medicine.* 341: 164-172
  - Era, T; O. Witte. (2000). Regulated expression of p210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:1737-1742.
  - Felgar, R. (1999). CD38: a orphan protein that may be finding a home. *Leukemia Research.* 24: 161-162.
  - Fernández, M; Simon V; J.J. Minguell. (2000). Production of soluble CD34 by human myeloid cells. *British Journal of Haematology.* 111:426-431.
  - Flanders, K; A. Roberts. TGF $\beta$ . (2001) Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. AP Press. pp 899.
  - Fortunel, N; Hatzfeld, A; J. Hatzfeld. (2000). Transforming growth factor- $\beta$ : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood.* 96: 2022-2036.

- Gabriele, L; Borghi, P; Rozera, C; Sestili, P; Andreotti, M; Guarini, A; Montefusco, E; Foa, R; F. Belardelli. (2004). IFN-alpha promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leucemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment. *Blood*. 103: 980-987.
- Gallacher, L; Murdoch, B; Wu, D; Karanu, F; Keeney, M; M. Bhatia. (2000). Isolation and characterization of human CD34<sup>lin</sup>- and CD34<sup>lin</sup>+ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 95:2813-2820.
- Gambacorti-Passerini, C; Barni, R; Marchesi, E; Verga, M; Rossi, F; Rossi, F; Pionelli, P, Pogliani, E; G. Corneo. (2001). Sensitivity to the abl inhibitor STI571 in fresh leukaemic cells obtained from chronic myelogenous leukaemia patients in different stages of disease. *Br. J of Haematol*. 112: 972-974.
- Goldman, J. (2000). Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 355: 1031-1032.
- Góngora-Bianchi, R; Selva-Pallares, J; Gómez-Almaguer, D; Meillon-García, L; Vela-Ojeda, J; Espinosa-Larrañaga, F; Grupo Colaborativo AMEH/LMC. (2005). Declaración Mexicana de Posición para el tratamiento de Leucemia Mieloide Crónica. *Revista de Hematología*. 6 (Supl 2): S1-S14.
- Gordon, M; Dowding, C; Riley, G; Goldman, J; M. Greaves. (1987). Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 328:342-344.
- Graham, S; Jorgensen, H; Allan, E; Pearson, C; Alcorn, M; Richmond, L; T, Holyoake. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 99: 319-325.
- Guo, Y; Lubbert, M; M Engelhardt. (2003). CD34<sup>-</sup> Hematopoietic Stem Cells: Current Concepts and Controversies. *Stem Cells*. 21: 15-20.
- Gutiérrez-Castellanos, S; Cruz, M; Rabelo, L; Godinez, R; Reyes, E; C. Riebeling. (2004). Differences in BCL-XL expresión and STAT5

- phosphorylation in chronic myeloid leukaemia patients. *Eur. J Haematol.* 72: 231-238.
- Holtz, M; Slovak, M; Zhang, F; Sawyers, C; Forman, S; R, Bathia. (2002). Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood.* 99: 3792-3800.
  - Holyoake, T; Jiang, X; Drummond, M; Eaves, A; C. Eaves. (2002). Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 16: 549-558.
  - Holyoake, T; Jiang, X; Eaves, C; A. Eaves. (1999). Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 94:2056-2064.
  - Holyoake, T; Jiang, X; Jorgensen, H; Graham, S; Alcorn, M; Laird, C; Eaves, A; C. Eaves. (2001). Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth *in vitro* in association with up-regulation of expression of interleukin-3. *Blood.* 97: 720-728.
  - Horita, M; Andrew, E; Benito, A. Et. Arbona, C; Sanz, C; Benet, I; Prosper, F; J. Fernández Luna. (2000). Blockade of the BCR/ABL kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-XL. *J. Exp. Med.* 191: 977-984.
  - Hu, X; Tang, M; Brown, A; Olashaw, N; K. Zuckerman. (1999). TNF $\alpha$ -induced growth suppression of CD34+ myeloid leukemic cell lines signals through TNF receptor type I and is associated with NF- $\kappa$ B activation. *J. of Immunol.* 163: 3106-3115.
  - Inukai, T; Sugita, K; Mitsui, K; Lijima, K; Goi, K; Tezuka, T; Kojika, S; Kagami, K; Mori, T; Kinoshita, A; Suzuki, T; Okasaki-Koyama, T; S. Nakazawa. (2000). Participation of granulocyte colony-stimulating factor in the growth regulation of leukemia cells from Philadelphia chromosome-positive acute leukemia and blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 14: 1386-1395.

- Ito, K; Tanaka, H; Ito, T; Sultana, T; Kyo, T; Imanaka, F; Ohmoto, Y; A. Kimura. (2004). Initial expression of interferon alpha receptor 2 on CD34-positive cells and its down regulation correlate with clinical response to interferon therapy in CML. *Eur J. of Haematol.* 73:191-205.
- Janowska-Wieczorek, A; Majka, M; Marquez-Curtis, L; Wertheim, J; Turner, A; M, Ratajczak. (2002). Bcr-abl positive cells secrete angiogenic factors including matrix metalloproteinases and stimulate angiogenesis in vivo in Matrigel implants. *Leukemia.* 16:1160-1166.
- Janssen, J; Rijn, V; Holt B; Schuurhuis, G; Vallenga, E; Verhoef, G; Ossenkoppele, G; Berg, E; Hagemeijer, A; Slater, R; Nieuwint, A; J. Cornelissen. (2000). Mobilisation of haemopoietic progenitors in CML: a second course of intensive chemotherapy does not improve Ph-negativity in stem cell harvests. *Bone Marrow Transplantation.* 25: 1147-1155.
- Jennings, B; K.Mills. (1998). C-myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 22: 849-903.
- Jiang, X; Lopez, A; Holyoake, T; Eaves, C; A. Eaves. (1999). Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 12804-12809.
- Jiang, Y; Zhao, R; and C. Verfaillie. (2000). Abnormal integrin-mediated regulation of chronic myelogenous leukemia CD34+ cell proliferation: Bcr/Abl up regulates the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27, which is relocated to the cell cytoplasm and incapable of regulating cdk2 activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 97: 10538-10543.
- Jonuleit, T; Pesche, C; Schwab, R; Van Der Kuip, H; Buchdunger, E; Fischer, T; Huber, C; W. Aulitzki. (1998). Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br. J. Haematol.* 100: 295-303.
- Jonuleit, T; Van der Kurip, H; Mielthing, C; Michels, H; Hallek, M; Dryster, J; W. Aulitzky. (2000). Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood.* 96: 1933-1939.

- Jorgensen, H; T. Holyoake. (2001). A comparison of normal and leukemic stem cell biology in chronic myeloid leukemia. *Hematological Oncology*. 19: 89-106.
- Kabarowski, J y O. Witte. (2000). Consequences of BCR-ABL expression within the hematopoietic stem cell in chronic myeloid leukemia. *Stem Cells*. 18: 399-408.
- Kasper, C; Ryder, W; During, J; Nagexh, K; Sarfee, J; Beelen, D; Schaefer, U; Chang, J; N. Testa. (1999). Content of long-term culture-initiating cells, clonogenic progenitors and CD34 cells in apheresis harvests of normal donors for allogeneic transplantation, and in patients with acute myeloid leukaemia or multiple myeloma. *Br. J. Haematol*. 104:374-381.
- Kindler, T; Breitenbuecher, F; Kasper, S; Stevens, T; Carius, B; Gschaidmeier, H; Huber, C; T. Fisher. (2003). In BCR-ABL positive cells, STAT5 tyrosine-phosphorylation integrates signal induced by imatinib mesylate and AraC. *Leukemia*. 17:999-1009.
- Kramer, A; Loffler, H; Bergmann, J; Hochhaus, A, R Hehlmann. (2001). Proliferating status of peripheral blood progenitors cells from patients with Bcr-Abl-positive chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 15: 62-68
- Krause, D.S; Fackler, M.J; Civin, C.I; W.S. May. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 87:1-13.
- Kuter, D. Thrombopoietin. *Cytokine Reference*. (2001). A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. AP Press. pp 899.
- Lange, T; Deiniger, M; Brand, R; Hegenbart, U; Al-Ali, H; Krahl, R; Poenisch, W; Uharck, L; Leiblein, S; Geintilini, C; Petersdorf, E; Storb, R; D, Niederwieser. (2004). Bcr-Abl transcripts are early predictors for hematological relapse in chronic myeloid leukemia after hematopoietic cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Leukemia*. 18: 1468-1475.
- Lee, S. (2000). Chronic Myelogenous Leukaemia. *British Journal of Haematology*. 111: 993-1009.

- Lozzio, C; B. Lozzio. (1975). Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line with Positive Philadelphia Chromosome. *Blood*. 45: 321-334.
- Luna-Bautista, F; Sánchez-Vale, E; Ayala-Sánchez, M; Morales-Polanco, M; Meillon-García, L; Benítez-Bribiesca, L; H. Mayani. (2003) Kinetics of hematopoiesis in bone marrow cultures from patients with chronic myeloid leukemia: effect of recombinant cytokines in Dexter-type long-term cultures. *Hematology*. 8:155-163.
- Lundell, B; McCarthy, J; Kovach, N; C. Verfaillie. (1997). Activation of beta 1 integrins on CML progenitors reveals cooperation between beta 1 integrins and CD44 in the regulation of adhesion and proliferation. *Leukemia*. 11: 822-829.
- Mahon, F; Belloc, F; Lagarde, V; Chollet, C; Moreau, F; Reifers, J; Goldman, J; J. Melo. (2003). MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 101: 2368-2372.
- Mahon, F; Deininger, M; Schulthes, B; Chabrol, J; Reifers, J; Goldman, J; J. Melo. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*. 96: 1070-1079.
- Marley, S; Deininger, M; Davidson, J; Goldman, J; M, Gordon. (2000). The tyrosine kinase inhibitors STI561 like interferon alpha preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors from patients with chronic myeloid leukemia. *Exp. Hematology*. 28: 551-557.
- Martín-Henao, G; Quiroga, R; Sureda, A; Gonzalez, J; Moreno, V; J. Garcia. (2000). L-selectin expression is low on CD34+ cells from patients with chronic myeloid leukemia and interferon- $\alpha$  up regulates this expression. *Haematologica*. 85:139-146.
- Matsuda, T; T, Hirano. IL-6. *Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense*. Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.
- Mayani, H, Dragowska, W; P; Lansdorp 1993. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34<sup>+</sup> cord blood cells in serum-

- free cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood*. 82: 2664-2672..
- Mayani, H; Alvarado-Moreno, J.A; P. Flores-Guzmán. (2003). Biology of Human Hematopoietic Stem and Progenitors Cells Present in Circulation. *Archives of Medical Research*. 34: 476-488.
  - Mayani, H; Gilbert, J; A, Janowska-Wieczorek. (1992). Biology of hemopoietic microenvironment. *Eur J. Haematol*. 94:225-233.
  - Mayani, H; P. Lansdorp. (1998). Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells*. 16: 153-165.
  - McNiece, I. K. (1992). Synergism of Hematopoietic Colony-Stimulating Factors. *The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 14: 31-38.
  - Million, R; R. Van Etten. (2000). The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood*. 96: 664-670.
  - Miyajima, A; Ito, Y; T. Kinoshita. (1999). Cytokine signaling for proliferation, survival and death in hematopoietic cells. *Int. J. of Hematology*. 69: 137-146.
  - Miyamura, K; Tahara, T; M. Tanimoto. 1993. Long persistent bcr-abl positive transcript detected by polymerase chain reaction after marrow transplant for chronic myelogenous leukemia without clinical relapse: a study of 64 patients. *Blood*. 81: 1089-1093.
  - Moore S; Haylock, D; Levesque, J; McDiarmid, L; Samels, L; To, B; Simmons, P; T. Hughes. (1998). Stem cell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia cells. *Blood*. 92: 2461-2470.
  - Morgan, M; Dolp, O; C. Reuter. (2001). Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood*. 97: 1823-1834.
  - Moritz, T; Kloke, O; Nagel, M; Kummer, G; Wandl, U, Opalka, B, Plappert, B; Kempeni, J; Seeber, S; N. Niederle. (1992). TNF $\alpha$  modifies

resistance to interferon alpha in vivo: first clinical data. *Cancer Immunol Immunother.* 35: 342-346.

- Morrison, S; Uchida, N; I. Weissman. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Anu Rev Cell Dev Biol.* 11: 35-71
- Nagata, S. G-CSF. *Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense.* Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.
- Nicola, N. (1989). Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev. Biochem.* 58: 45-77.
- Nicola, N. GM-CSF. *Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense.* Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.
- Orlic, D; D.M, Bodine. (1994). What Defines a Pluripotent Hematopoietic Stem Cell (PHSC): will the real PHSC Please Stand Up. *Blood.* 12: 3991-3994.
- Osawa, M. Haada, K; Hamada, H; H, Nakauchi. (1996). Long Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative hematopoietic Stem Cell. *Science.* 273: 242-245
- Pendergast, A; Gishizky, M; Havlik, M; O. Witte. (1993). SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1728-1736.
- Petzer, A; E. Gunsilius. (2003). Hematopoietic Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia. *Archives of Medical Research.* 34: 496-506.
- Petzer, A; Eaves, C; Barnett, M; A. Eaves. (1997). Selective expansion of primitive normal hematopoietic cells in cytokine-supplemented cultures of purified cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 90: 64-69.
- Piller, G. (2001). Leukaemia – A brief historical review from ancient times to 1950. *British Journal of Haematology.* 112: 282-292.
- Poliak, K. (1996). Negative regulation of cell growth by TGF $\beta$ . *Biochemica et Biophysica Acta.* 1242: 185-199.

- Pulendran, B; S, Dillon. (2001). Flt-3 Ligand. Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.
- Radich, J; Gehly, G; T, Gooley. (1995). Polymerase chain reaction detection of the BCR-ABL fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: results and implications in 342 patients. *Blood*. 85: 2632-2638.
- Rafii, S. (1994). Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hemopoietic progenitor cell adhesion. *Blood*. 84: 10-19
- Ramsfjell, V; Borge, O; Cui, L; S. Jacobsen. (1997). Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34+CD38-) human bone marrow progenitor cells: distinct and key interactions with the ligands for c-kit and flt3, and inhibitory effects of TGF-beta and TNF-alpha. *J. Immunol*. 158: 5160-5177.
- Rappolee, D; Z, Webb. (1988). Secretory products of phagocytes. *Curr. Opin. Immunol*. 1: 47-55.
- Rauther, J; Reuther, G; Cortez, D; Pendergast, A; A. Baldwin. (1998). A requirement for NF-kappa B activation in BCR/ABL- mediated transformation. *Genes Dev*. 12: 968-961.
- Reuther, G; Fu, H; Cripe, L; Collier, R; M. Pendergast. (1994). Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins 14-3-3 family. *Science*. 266: 129-133.
- Roumiantsev, S; Shah, N; Gorre, M; Nicoll, J; Brasher, B; Sawyers, C; R. Van Etten. (2002). Clinical resistance to the kinase inhibitor STI571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:1000-1005.
- Rowley, J. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 243: 290-293.

- Roy-Keller, J; D. Linnekin. (2001). Stem Cell Factor. Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.
- Rusten, L; S. Jacobsen. (1995). Tumor necrosis factor (TNF)-alpha directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood*. 85: 989-996.
- Rusten, L; Smeland, E; Jacobsen, F; Lien, E; Lesslauer, W; Loetscher, H; Dubois, C; S, Jacobsen. (1994). Tumor necrosis factor-alpha inhibits stem cell factor-induced proliferation of human bone marrow progenitor cells in vitro: Role of p55 and p75 tumor necrosis factor receptors. *J. Clin. Invest.* 94:165-172.
- Savage, D; J. Goldman. (1997). Allografting for chronic myeloid leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 4: 369-376.
- Sawyers, C. (1992). The bcr-abl gene in chronic myelogenous leukaemia. *Cancer Surveys*. 15: 37-51.
- Sawyers, C. (1999). Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 340:1330- 1340.
- Sawyers, C. (2001). Molecular studies in Chronic Myeloid Leukemia patients treated with Tyrosine Kinase Inhibitors. *Seminars in Hematology*. 38. Suppl 8: 15-21.
- Sawyers, C; McLaughlin, J; O. Witte. (1995). Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the BCR/ABL oncogene. *J. Exp. Med.* 181: 307-313.
- Schareder, J. IL-3. Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense. Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.
- Schutte, J; Opalka, B; Becher, R, Bardenheuer, W; Szymanski, S; Lux, A; S. Seeber. (1993). Analysis of p53 gene in patients with isochromosome 17q and Ph-positive or negative myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 17: 533-539.
- Selleri, C; Maciejewske, J; Pane, F; Luciano, L; Raiola, A; Mostarda, I; Salvatore, F; B. Rotoli. (1998). Fas-mediated modulation of Bcr/Abl in

chronic myelogenous leukemia results in differential effects on apoptosis. *Blood*. 92: 981-989.

- Shet, A; Jahagirdar, B; C. Verfaillie. (2002). Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia*. 8: 1402-1411
- Short, B; Brouard, N; Occhiodoro-Scott, T; Ramakrishnan, A; P. Simmons. (2003). Mesenchymal Stem Cells. *Archives of Medical Research*. 34: 565-571.
- Sick, C; Schultheis, B; Pasternak, G; Kottke, I; Horner, S; Heissig, B; R, Hehlmann. (2001). Predominantly BCR-ABL negative myeloid precursors in interferon-alpha treated chronic myelogenous leukemia: a follow-up study of peripheral blood colony-forming cells with fluorescence in situ hybridization. *Ann. Hematol*. 80:9-16.
- Sillaber, C; Mayerhofer, M; Aichberger, K; Krauth, M; P. Valent. (2004). Expression of angiogenic factors in chronic myeloid leukaemia: role of the bcr/abl oncogene, biochemical mechanisms, and potential clinical implications. *Eur. J. Clin. Invest*. 34: Suppl 2: 2-11.
- Sill, H; Goldman, J, N. Cross. 1995. Homozygous deletion of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 85: 2013-2016.
- Solanilla, A; Andaloussi, A; Frosset, C; Duchez, P; Mossalayi, M; Mahon, F; Reiffers, J; Marit, G; J. Ripoche. (2000). Differential effect of interferon alpha on chronic myelogenous leukemia and normal hematopoietic progenitors in a stromal cell co-culture context : role of the flt3 ligand. *Br. J. Haematol*. 109: 382-387.
- Spivak, J. Erythropoietin. *Cytokine Reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense*. Edited by Joost J. Oppenheim & Marc Feldmann. (2001). AP Press. pp 899.
- Strauss, L.C; Rowley, S.D; La Russa, V.F; Sharkis, S.J; Stuart, R.K; C.I. Civin. (1986). Antigenic analysis of hematopoiesis. Characterization of My10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Experimental Hematology*. 14: 878-886.

- Sutherland, H.J; Lansdrop P.M; Henkelman, D.H; Eaves, A.C., C.J. Eaves. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:3584-3588.
- Szilvassy, S. (2003). *The Biology of Hematopoietic Stem Cells.* *Archives of Medical Research.* 34: 446-460.
- Szilvassy, S; R. Hoffman. (1995). Enriched hematopoietic stem cells: Basic biology and clinical utility. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 1: 3-17.
- Talpaz, M. (2001). Interferon-alfa- based treatment of Chronic Myeloid Leukemia and Implications of Signal Transduction Inhibition. *Seminars in hematology.* 38. Suppl 8: 22-27.
- Talpaz, M. Spitzer, G; Hittleman, W; Kantarjian, H; J. Gutterman. (1989). Changes in granulocyte-monocyte colony forming cells among leukocyte-interferon treated chronic myelogenous leukemia patients. *Exp. Hematol.* 14: 668-671.
- Tavassoli, M. (1993). Hematopoietic survival factors. *Experimental Hematology.* 21: 1511-1513.
- Todisco, E; Suzuki, T; Srivannaboon, K; Coustan-Smith, E; Raimondi, S; Behm, F; Kitanaka, A; D. Campana. (2000). CD38 ligation inhibits normal and leukemic myelopoiesis. *Blood.* 95: 535-542.
- Traycoff, C; Halstead, B; Rice, S; McMahel, J; Srour, E; K. Cornetta. (1998). Chronic myelogenous leukaemia CD34+ cells exit G0/G1 phases of cell cycle more rapidly than normal marrow CD34+ cells. *Br. J Haematol.* 102: 759-767.
- Tsao, A; Kantarjian, H; M. Talpaz. (2002). STI-571 in Chronic Myelogenous Leukemia. *British Journal of Haematology.* 119: 15-24.
- Udomsakdi, C; Eaves, C; Landsdorp, P; A. Eaves. (1992). Phenotypic heterogeneity of primitive leukemic hematopoietic cells in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 80:2522-2530.
- Udomsakdi, C; Eaves, C; Swolin B; Reid, D; Barnett, M; A. Eaves. (1992). Rapid decline of chronic myeloid leukemic cells in long term

- culture due to a defect at the leukemic stem cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:6192-6196.
- Verfaillie, C; Hurley, R; Lundell, B; Zhao, C; R. Bathia. (1997). Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do Bcr/Abl induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors. *Acta Hematol.* 97:40-52.
  - Verfaillie, C; Miller, W; Boylan, K; P. McGlave (1992). Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the bases of HLA-DR antigen expression. *Blood.* 79: 1003-1010.
  - Wandl, U; Opalka, B; Kloke, O; Nagel, M; Moritz, T; N. Niederle. (1992). Treatment of chronic myelogenous leukemia with different cytokines. *Semin Oncol.* 19:88-94.
  - Wang, J. (2000). Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene.* 19: 5643-5650.
  - Wendling, F. (1999). Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production. *Haematologica.* 84:158-166.
  - Witte, O. (2001). The role of Bcr-Abl in chronic myeloid leukemia and stem cell biology. *Semin. Hematol.* 38. Supl 8: 3-8.
  - Wognum, A.W; Eaves, A.C; T.E. Thomas. (2003). Identification and Isolation of Hematopoietic Stem Cells. *Archives of Medical Research.* 34: 461-475.
  - Zanjani, E; Almeida-Porada, G; Livingston, A; Flake, A; M, Ogawa. (1998). Human bone marrow CD34<sup>-</sup> cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34<sup>+</sup> cells. *Experimental Hematology.* 26: 353-360.
  - Zhao, R; Jiang, Y; C. Verfaillie. (2001). A model of human p210 bcr-abl mediated chronic myelogenous leukemia by transduction of primary normal human CD34<sup>+</sup> cells with a BCR/ABL containing retroviral vector. *Blood.* 97: 2406-2412.
  - Zhao, R; Tarone, G; C. Verfaillie. (1997). Presence of the adhesion inhibitory  $\beta 1b$  integrin isoform on CML but not normal progenitors is at least in part responsible for the decreased CML progenitor adhesion. *Blood.* 90: 393a.

## Anexo

Los artículos publicados pueden ser consultados en:

Chavez González, Antonieta... [et. al]. Severe functional alterations in vitro in CD34+ cell subpopulations from patients with chronic myeloid leucemia. En: Leukemia research 28 (2004) 639-647

Chavez González, Antonieta... [et. al]. Functional integrity in vitro hematopoietic progenitor cells from patients with chronic myeloid leukemia that have achieved hematological remission after different therapeutic procedures. En: Leukemia research 30 (2006) 286-295