

HEMATOPOYESIS IN VITRO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ANEMIA DE FANCONI Y SÍNDROME DE DIAMOND-BLACKFAN.

Martínez-Jaramillo G, Espinoza-Hernández L, Benítez-Aranda H*, Mayani H. Laboratorio de Hematopoyesis, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. *Servicio de Hematología, Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F.

La Anemia de Fanconi (AF) y el Síndrome de Diamond-Blackfan (SDB) se caracterizan por la deficiente producción de células hematopoyéticas. En la AF, las alteraciones hematopoyéticas afectan prácticamente a todos los linajes mieloides, mientras que en el SDB existe una deficiencia selectiva en el linaje eritroide. El objetivo del presente estudio fue caracterizar las cinéticas de crecimiento in vitro de los progenitores hematopoyéticos (PH; eritroides, mieloides y pluripotenciales) de pacientes con AF y SDB. El efecto de los factores recombinantes GM-CSF y EPO fue también analizado. Siete pacientes pediátricos (4 con AF y 3 con SDB) fueron incluidos en este estudio. Muestras de médula ósea de 5 niños hematológicamente sanos fueron empleadas como control. Las células mononucleares obtenidas de cada muestra fueron sembradas en cultivos líquidos a largo plazo, de acuerdo al método de Dexter. La cinética de proliferación de los PH, en presencia o ausencia de GM-CSF y EPO, fue seguida por 7 semanas. Al momento de iniciar el cultivo a largo plazo, los pacientes con AF presentaron niveles extremadamente reducidos tanto de progenitores mieloides, como de progenitores eritroides y pluripotenciales. Por su parte, los pacientes con SDB presentaron niveles normales de progenitores mieloides, sin embargo, sus niveles de progenitores eritroides fueron muy bajos. En cultivos a largo plazo, los PH de niños normales fueron detectados durante las 7 semanas; a diferencia de esto, en los pacientes con AF dichos progenitores fueron detectados por 1-2 semanas. En los niños con SDB, los progenitores eritroides fueron detectados solamente en las dos primeras semanas de cultivo. Los progenitores mieloides, por su parte, presentaron niveles normales durante las primeras tres semanas de cultivo, sin embargo, a partir de la cuarta semana sus niveles decayeron muy por debajo de los niveles normales. Ni GM-CSF ni EPO tuvieron efecto alguno en los cultivos de AF. En cultivos de SDB, el efecto de estos dos factores fue muy limitado y transitorio. Nuestros resultados apoyan el concepto de que en AF, el daño hematopoyético ocurre a nivel de células seminales. Una observación totalmente nueva derivada de nuestro estudio es que en el SDB no sólo la línea eritroide, sino también la mioide, se encuentra afectada. Finalmente, los efectos tan pobres mostrados por GM-CSF y EPO concuerdan con los efectos mínimos observados en la clínica.

EL GM-CSF ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN DE PROGENITORES LEUCEMICOS EN CULTIVOS DE MEDULA ÓSEA A LARGO PLAZO DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.

Montesinos-Montesinos JJ*, Sánchez-Valle E, Mayani H*. Laboratorio de Hematopoyesis, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas*. Servicio de Hematología, Hospital de Especialidades*. Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F.

El cultivo de médula ósea a largo plazo (LTBMC) ha permitido el estudio in vitro del comportamiento de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), para establecer algunas de sus características biológicas. En el presente estudio se evaluó la cinética de proliferación de CPH de pacientes con LMA en LTBMC en presencia del factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). Para ello se obtuvieron muestras de médula ósea de 12 pacientes con LMA de novo y de 8 donadores sanos. Se establecieron LTBMC en presencia o ausencia de GM-CSF y se analizaron las cinéticas de proliferación de células nucleadas totales, así como de progenitores formadores de colonias mieloides, eritroides y de blastos. Los resultados demuestran que existe una disminución de 4 y 5 veces (días 21 y 28 de cultivo respectivamente) en el número de células no adherentes en LTBMC de los pacientes con LMA en comparación con aquellos de individuos sanos. La adición del GM-CSF a los LTBMC de pacientes con leucemia, estimuló la proliferación de las células no adherentes durante las 6 semanas de cultivo (incremento de 2 a 3 veces con respecto al control). Por su parte el número de progenitores hematopoyéticos se encontró disminuido en los LTBMC de los pacientes con leucemia en comparación con aquellos de individuos sanos. Sin embargo, en presencia de GM-CSF se favoreció la proliferación de progenitores leucémicos a partir de la segunda semana de cultivo, mientras que en ausencia de este factor se favoreció la proliferación de progenitores normales a partir de la tercera semana. Estos resultados indican que existe una deficiencia en el crecimiento de CPH en LTBMC de pacientes con LMA y además que el GM-CSF estimula la proliferación de los progenitores leucémicos. Lo anterior podría ser considerado como un aspecto a evaluar en la aplicación del GM-CSF en el tratamiento de pacientes con LMA.

APOPTOSIS, PROLIFERACIÓN CELULAR Y SOBRE-EXPRESIÓN DE p53 EN CÉLULAS LEUCEMICAS TRATADAS CON TRIOXIDO DE ARSENICO.

Mejía D.A.M., Salazar MAM., SordoCM., Ostrosky WP. Hospital Inf. de México "Federico Gómez" e Inst. de Inv. Biomédicas UNAM. México D.F.

Antecedentes: Reportes recientes mencionan al Trióxido de Arsénico en el tratamiento de Leucemias Promielocíticas Agudas, a través de cito-diferenciación incompleta y otros como alteración en la Proliferación Celular in-vitro e in-vivo en linfocitos, por la modulación de genes estudiando a p53, tanto como en la proliferación y muerte celular, en este estudio se prueba este agente ante linfocitos normales y células leucémicas.

MATERIAL Y METODO: Se hacen dos ensayos de 20 muestra cada uno tanto de una población clínicamente sana, con cultivo de Sangre total, así como de pacientes con Leucemias Agudas de Novo, con cultivo para el estudio del Ciclo de la Proliferación Celular midiendo INDICE MITOTICO e INDICE DE DIVISION NUCLEAR y evaluación de la diferenciación y presencia de cambios Apoptóticos. El otro ensayo corresponde al cultivo de células mononucleares de los dos grupos, con tratamiento con Trióxido de Arsénico a 0.1, 1.0 y 10.0 mM /24hs., (el tratamiento in-vitro en los dos tipos de cultivo), en el cultivo de células mononucleares se realizó p 53 por técnica de WESTERN-BLOT.

RESULTADOS: En 15 de las 20 muestras para cada grupo se lograron los cultivos, por contaminación y número bajo de células, encontrando en el estudio de proliferación celular que el IM (Índice mitótico) en las células Leucémicas sin tratamiento es mayor a las células normales (p menor 0.05) y este valor va disminuyendo inversamente proporcional a la concentración del Trióxido de Arsénico, semejante los hallazgos del Índice de división nuclear, con citotoxicidad en la dosis de 10.0mM. La citodiferenciación en las leucémicas a concentración de 1.0 mM es incompleta a 0.1mM. Los cambios apoptóticos (Cuerpos apoptóticos) se inicia a 1.0 y muy evidente a 10.0mM. La p53, con mínima expresión en células sin tratamiento y mayor a 1.0mM y desaparece a 10.0 mM.

EFFECTO DE G-CSF, GM-CSF Y EPO EN CULTIVOS A LARGO PLAZO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Luna E*, Ayala M*, Mayani H*. Lab. de Hematopoyesis, U. de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas Centro Médico Nacional Siglo XXI*. Serv. de Hematología, Hospital de Especialidades Centro Médico "La Raza" *. IMSS, México D.F.

El Sistema de Cultivo a Largo Plazo tipo Dexter (LTC) de Médula Ósea (MO) de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC), ha evidenciado la existencia de una población normal de Células Seminales Hematopoyéticas (CSH) la cual se encuentra suprimida. La eliminación del clon Ph⁺ de estos cultivos, sugiere la existencia de importantes diferencias en la respuesta de la mezcla de progenitores Ph⁺ y Ph⁻ al Microambiente Hematopoyético (MH). Citocinas hematopoyéticas, matriz extracelular, además de diversos tipos celulares, conforman los principales elementos reguladores de progenitores en el MH. Con la finalidad de buscar causas de este fenómeno, el presente trabajo consistió en estudiar in vitro el efecto de G-CSF, GM-CSF o Epo en la cinética estándar de proliferación y diferenciación de células mononucleares (MNC) de MO de pacientes con LMC. Empleando los sistemas de cultivo LTC y de colonias (Colony Assay), se cultivaron células MNC de MO de pacientes con LMC, tanto en condiciones estándar como en presencia de G-CSF, GM-CSF y Epo. La valoración de células MNC totales en suspensión (no adherentes), y de progenitores se realizó semanalmente. Las células totales y progenitores estromales (adherentes), se evaluaron quincenalmente. Los datos obtenidos se graficaron contra controles normales. Los resultados indicaron que, aunque la incorporación de G-CSF al LTC de LMC aumentó el número de células totales no adherentes (principalmente línea granulocítica), dicho estímulo no bastó para alterar la permanencia de estas células en el cultivo, ya que su curva al final tendió a igualarse con el control estándar. La cinética de progenitores para este factor varió según el progenitor es decir, mieloides aumentaron rápida- pero limitadamente concluyendo por debajo del control. Eritroides no parecieron ser afectados por esta citocina y solo las células multipotenciales parecieron tener un estímulo tardío, ya que temporalmente estuvieron arriba del control en LTC. La cinética de células adherentes (totales y Progenitores) no refleja diferencias importantes. GM-CSF proporcionó el aumento más significativo en la proliferación total de MNC no adherentes, prolongando un poco la permanencia de estas células en el cultivo. Los progenitores estimulados con este factor siguieron el mismo patrón general de G-CSF, salvo que el efecto fue mayor en multipotentes y poco evidente en mieloides. Epo además de demostrar su mayor especificidad en eritroides tanto adherentes como no adherentes mostró un leve efecto inhibitorio en mieloides respecto al control de cultivo. Por lo anterior se concluye que un aumento tanto de G-CSF como GM-CSF en este sistema de cultivo, puede influir en la permanencia de células de MO de pacientes con LMC, probablemente a nivel de progenitores primitivos.

HEMATOPOYESIS

DETECCIÓN Y EVOLUCIÓN DE MONOCLONAS EN MEDULA ÓSEA Y SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON DESÓRDENES LINFOPROLIFERATIVOS DE CELULAS B MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DE CDR3.

Barros-Núñez P, Leal E, Jaloma AR, Aguilar C*, López B*, Esparza M*, Delgado JL*, Galarza M*, Medina C, División de Genética-CIBO. Dep. Hematología-CMNO*. IMSS. Guadalajara, Jalisco.

OBJETIVO: Correlacionar resultados de la amplificación de CDR3 en MO y SP de pacientes con desórdenes linfoproliferativos de células B.

MATERIAL Y METODOS.

- Separación de linfocitos por gradiente de Ficoll-Hypaque
- Extracción del ADN mediante fenol-cloroformo / CTAB, a partir de 5 mL de SP y 2 mL de MO.
- PCR-nested. La 1era PCR amplifica CDR2 y CDR3. La 2da PCR (anidada) amplifica solo CDR3.
- Visualización del amplificado por electroforesis en poliacrilamida al 6%. Tinción con nitrato de plata.

RESULTADOS. En un lapso de 9 meses se capturaron 100 pacientes con diagnóstico de leucemia o linfoma de células B, antes de iniciar su tratamiento de inducción. En la gran mayoría de ellos pudimos amplificar y visualizar la región CDR3. En 57 de los 61 pacientes (93%), en quienes tuvimos muestras de MO y SP al inicio del tratamiento, se observaron resultados congruentes entre los dos tejidos. De los 4 no coincidentes, 3 mostraron monoclonas solo en SP. Al final del tratamiento, en 19 de 21 pacientes (90%) hubieron resultados coincidentes entre MO y SP. En los 2 no congruentes, la monoclonas se observó solo en MO. En 16 pacientes la evolución monoclonal-policlonal fue atípica, lo que fue explicado por abandono del tratamiento o errores diagnósticos.

CONCLUSIONES Estos resultados preliminares sugieren que, tanto la detección como el seguimiento de la evolución de las monoclonas en estos pacientes, puede lograrse amplificando CDR3 en muestras de sangre periférica en forma confiable y segura.

LA COMBINACIÓN DEL IFN γ CON M-CSF O CON LA IL-6 REDUCE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES Fc EN LAS CÉLULAS 32D. E. Santiago, I. Martínez, G. Ramos*, B. Manrique, B. Weiss. FES-Zaragoza, UNAM, México.

Previamente se ha reportado que algunas citocinas individualmente inducen la expresión de receptores para la IgG (Fc γ R) en las células mieloides primitivas 32D. Considerando que en *in vivo* difícilmente se da un estímulo individual, el **objetivo** de presente estudio es evaluar si la combinación de citocinas favorece mayor expresión Fc γ R. **Metodología y resultados.** Las células hematopoyéticas multipotenciales 32D de ratón, dependiente de IL-3 fueron cultivadas durante 48 horas con 0.5 ng/ml de IL-3 de ratón en presencia o ausencia de 50 ng/ml de interleucina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), de granulocitos (G-CSF) en combinación o no con 50 U/ml de interferon-gama (IFN γ), un clásico inductor de receptores Fc. Usando la técnica de rosetas EA (fijación a los receptores Fc de eritrocitos de carnero activados con anticuerpos anti-eritrocitos) se encontró que la combinación de IL-6/IFN γ y M-CSF/IFN γ , pero no G-CSF/IFN γ , redujeron la formación de rosetas (85, y 50% respectivamente), comparado con el efecto de las citocinas individuales. **Discusión y conclusiones.** Los datos sugieren que la combinación de citocinas con el IFN γ no favorecen la expresión de receptores Fc y dependiendo de la citocina, incluso se reduce casi a niveles basales. Los datos puede explicar porque las células precursoras obtenidas de médula ósea, aunque rodeadas de citocinas, difícilmente expresan receptores Fc. Considerando que la expresión de receptores Fc es un índice de diferenciación mieloides, es posible que un desbalance en las señales de citocinas, también constituya una alternativa para controlar la diferenciación.

Trabajo apoyado por PAPIIT IN213397, UNAM. *Becario de CONACYT-DGAPA

LA CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE *Justicia spicigera* ("MUICLE") EN LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS HEMATOPOYÉTICAS Y NO HEMATOPOYÉTICAS ES DEPENDIENTE DEL CICLO CELULAR. ▲J.R. Cáceres Cortés, ▲M. Benchegroun, ▲B. Guerin. ▲Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES Zaragoza UNAM, México D.F.; México ▲Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

La infusión de la planta *Justicia spicigera* ("muicle" del nahuatl) se ha usado en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de disenteria, infecciones renales, control de la menstruación, tónico, febrífugo, cataplasma para llagas, anemia y leucemia. El extracto acuoso de las hojas es rojo por luz refleja y azul por luz transmitida. De las hojas se han aislado el flavonoide kaempferitrina, β -sitosterol, 3-O-glucosido de β -sitosterol, alantoina y criptoxantina. La forma no glucosilada de la kaempferitrina, el kaempferol, se ha reportado que tiene efecto mutagénico sobre *Salmonella typhimurium*. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio revelan que el extracto acuoso de muicle no tiene actividad hematopoyética *in vitro*, tanto en progenitores hematopoyéticos humanos como de ratón. Nuestros resultados en el presente estudio, revelaron que el HPLC de fase reversa del extracto acuoso y metanólico de muicle mostró dos picos a 254 nm de absorbancia. El pico relacionado con la coloración rojiza soluble en agua contiene los compuestos glucosilados, tales como la kaempferitrina. Este pico es menos abundante en la extracción metanólica que es de color verde. Con la finalidad de demostrar un efecto citotóxico anti cáncer del extracto acuoso de *Justicia spicigera* que contiene kaempferitrina, se realizaron ensayos de citotoxicidad en cultivos de células leucémicas (TF-1, TB-1), carcinoma cervical (CALO, INBL) y como control células multipotentes hematopoyéticas 32D y fibroblastos normales (3T3). Los datos muestran un efecto citotóxico dosis dependiente y en estrecha relación con el ciclo celular, independiente del estado de transformación celular. Es interesante observar que sobre las células TB-1 (células TF-1 transfectadas con el proto-oncogen bcl-2 inhibidor de la apoptosis) el extracto acuoso de muicle no tuvo efecto citotóxico. Se propone como mecanismo de acción citotóxica del muicle la liberación por hidrólisis de kaempferol y glucosa a partir de la kaempferitrina induciendo apoptosis dependiente del ciclo celular.

LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PU.1 REGULA A LA ALTA LA EXPRESIÓN DEL ANTIGENO DE CÉLULA MADRE SCA-1 E INDUCE LA DIFERENCIACIÓN ESPONTÁNEA DE MACRÓFAGOS EN CÉLULAS MULTIPOTENCIALES HEMATOPOYÉTICAS FDCP Mix. ▲J.R. Cáceres Cortés, ▲A. Hamman. ▲Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza-UNAM; México D.F., México ▲Clinical Research Institute of Montreal, Quebec, Canada.

Durante el proceso de desarrollo, las células multipotenciales y progenitoras celulares hematopoyéticas se enfrentan a diferentes opciones tales como: quiescencia, autorrenuevo, proliferación, diferenciación y apoptosis. De entre ellas, la diferenciación de precursores hematopoyéticos comprometidos hacia un linaje particular, a partir de células multipotenciales, involucra la selección y elaboración de programas de expresión genética que mantienen la producción de al menos ocho tipos diferentes de células. Dichos programas, y por lo tanto la especificidad de linaje, están regulados por factores de transcripción. La utilización de líneas celulares multipotentes, que mantienen inalterado su potencial de diferenciación *in vitro*, es importante para clarificar el papel que juegan los factores de transcripción durante el proceso de diferenciación. Con la finalidad de investigar el papel de la sobre-expresión de factores de transcripción en líneas celulares hematopoyéticas planteamos la hipótesis de que estos factores pudieran inducir diferenciación celular sin la participación de factores de crecimiento tales como GM-CSF y EPO. Utilizamos como modelo de estudio la línea FDCP mix, una línea celular hematopoyética multipotente de ratón, y líneas transfectadas de ella con los genes PU.1 y SCL (FDCP PU.1, FDCP SCL) que codifican para dos factores de transcripción reconocidos por su acción determinante en la diferenciación de macrófagos y células rojas, respectivamente. Demostramos por citometría de flujo que las líneas celulares FDCP mix, FDCP PU.1 y FDCP-SCL son Sca-1⁺ [87%, 87%, 45%], Mac-1⁺ [34%, 46%, 19%], Gr-1⁺ [14%, 25%, 6%] y Ter 119⁺ cuando son mantenidas *in vitro* en medio de cultivo IMDM/10% MC WEHI/20% SC. Nuestros resultados revelan que la sobre-expresión de PU.1 favoreció la diferenciación espontánea de macrófagos (Mac-1) y la expresión del antígeno de célula madre (Sca-1) en la línea celular FDCP PU.1, sobre la formación de granulocitos (Gr-1) y progenitores eritroides (Ter 119). Como conclusión podemos decir que la sobre-expresión del factor de transcripción PU.1 en la línea celular FDCP mix, que no se diferencia espontáneamente, si modifica su fenotipo al generar más células que expresan Sca-1 y Mac-1.

INTERACCION DE RECEPTORES DE IL-2 Y c-Kit. J. A. Alvarado Moreno, R. Rangel, Corona, J.R. Cáceres Cortés. Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza UNAM, México D.F.; e-mail rancor@servidor.unam.mx,

El gene c-kit/W codifica para una proteína tirosina cinasa transmembranal, la cual es el receptor para el factor de células totipotenciales (SCF), que estimula la supervivencia, proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, melanocitos y células primordiales. Por otro lado, el efecto de Interleucina 2 (IL-2) en la activación de linfocitos T es mediado a través de su receptor, constituido por tres cadenas (RIL-2 α β γ), codificadas por tres diferentes genes: la cadena α (p55), contribuye únicamente a la unión de IL-2 con el receptor, mientras que β (p75) y γ (p64), ayudan a la unión y transducción de la señal intracelular. La cadena β se ha demostrado que tiene homología con el receptor de Eritropoyetina (REpO). En la línea celular hematopoyética HCD57 dependiente de EpO y que expresa REpO y c-Kit, SCF regula la fosforilación en tirosina de REpO para mantener su proliferación y maduración en Unidades Eritroides Formadoras de Colonias (CFU-E). Recientemente nuestro grupo de trabajo determinó la presencia del complejo del RIL-2 y de c-Kit en un modelo de células de carcinoma cervical; por lo que en el presente trabajo se planteó la hipótesis de que los dos receptores RIL-2 y c-Kit colaboran en la proliferación celular, mediante la fosforilación en tirosina de la cadena β por parte de c-Kit. Se observó que SCF induce proliferación, y la coestimulación con IL-2/SCF produjo un efecto aditivo, medido por la técnica de timidina tritiada. Esto indica que la presencia de ambos factores de crecimiento activan la proliferación. Se encontró que el receptor c-Kit fosforila RIL-2 β por la técnica de Western blot, y que al utilizar inhibidores de tirosina cinasa específicos contra c-Kit disminuye la fosforilación de RIL-2 β . Nuestros resultados sugieren que c-Kit regula la proliferación celular y colabora con otros receptores como el RIL-2 β mediante la fosforilación en este proceso. Describimos aquí un nuevo sustrato de c-Kit, la cadena β del RIL-2, cuya activación puede afectar la proliferación celular de líneas que expresan ambos receptores tales como linfomas y carcinoma cervical, en donde la presencia de c-Kit puede conferir sobrevivencia y sostener la proliferación de linajes celulares, proporcionando información valiosa sobre la regulación del microambiente celular normal o en proceso neoplásico.

EL USO DE PROTEINAS DE FUSION COMO MODIFICADORES DE LA RESPUESTA INMUNOGENICA DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA. R. Rangel, Corona, M.T Corona Ortega, M.Penichet y B. Weiss Steider. Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza UNAM, México D.F.; México e-mail rancor@servidor.unam.mx. ♦ Department of Microbiology and Genetic University of California

Recientemente las técnicas de ingeniería genética han permitido el diseño y producción de anticuerpos bispecíficos así como la producción de proteínas de fusión que en la actualidad tienen importante aplicación en la clínica para el tratamiento de diversos tipos de tumores con resultados alentadores. Uno de los desarrollos más importantes en este aspecto ha sido la generación de moléculas que portan IL-2 para proveer la acumulación de niveles adecuados de esta citocina en el microambiente tumoral para inducir una respuesta inmune adecuada. Finalmente, debemos mencionar que la generación de anticuerpos bispecíficos dirigidos contra el RIL-2 y alguna molécula de adhesión, la generación de una proteína de fusión con estos determinantes permitiría la modificación de la respuesta inmune *in vitro* e *in vivo*. Con el propósito de evaluar el efecto de una proteína de fusión que porta dos moléculas de IL-2 sobre la activación *in vitro* de Leucocitos de Sangre Periférica, en el presente trabajo se evaluó por medio de la técnica de cristal violeta, MTT y tinción con giemsa la proliferación de leucocitos de sangre periférica humana, en presencia de diferentes concentraciones de las proteínas de fusión TAPW, TAAK OLD usando como control positivo IL-2 recombinante humana (rIL-2h). Los resultados a 7 y 15 días muestran que tanto rIL-2h como las proteínas de fusión inducen una gran activación de la proliferación, sin embargo el porcentaje de proliferación en presencia de los anticuerpos supera en un 40% a la obtenida con rIL-2h. Esto nos hace pensar que el uso de proteínas de fusión son una buena alternativa para modificar la respuesta biológica de leucocitos humanos con el propósito de inducir o detener su proliferación y por el hecho de contar con un anticuerpo dirigido hacia antígenos particulares de las células blanco esto permitiría una manipulación controlada.

PRESENCIA DE M-CSF EN LOS MEDIOS CON DICCIONADOS DE LAS CÉLULAS 32D DIFERENCIADAS HACIA EL LINAJE MONOCITO-MACRÓFAGO POR EL CASEINATO DE SODIO (CasNa). G. Ramos*, B. Manrique, B. Weiss, E. Santiago, F.E.S. "Zaragoza", UNAM, México D.F.

Debido a que recientemente reportamos que el Caseinato de Sodio (CasNa), induce diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de la línea progenitora mieloide 32D, el **objetivo** del presente trabajo es determinar si en este evento se libera alguna(s) citocina implicada en la diferenciación macrofágica. **Métodos y Resultados:** Se realizó una cinética de diferenciación (0 a 5 días) de las células 32D en presencia o ausencia de 2 mg/mL de CasNa y los medios condicionados (MC's) fueron colectados. La presencia de factores estimuladores de colonias en los MC's fue evaluada en cultivos semisólidos en agar con células de médula ósea de ratón. Sólo los MC's del 3^o, 4^o y 5^o día de los cultivos con CasNa presentaron una fuerte actividad generadora de colonias (96, 108 y 115 colonias/pozo respectivamente). La tinción con Giemsa reveló la generación de colonias del linaje monocito-macrófago (84%). Como esta actividad es típica del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), al adicionar el anticuerpo anti M-CSF de ratón a los ensayos de colonias se observó un bloqueo contundente. **Conclusiones:** Los resultados sugieren que en los MC's de las células 32D tratadas con CasNa, existe M-CSF, por lo que es posible que este sea el responsable final del efecto diferenciador promovido por el CasNa. De comprobar que las células progenitoras son capaces de secretar citocinas y utilizarlas para su propia diferenciación, sugiere que este tipo de células tienen un papel más activo en el control de la hematopoyesis de lo que hasta hoy se ha propuesto.

Trabajo apoyado por PAPIIT IN213397, UNAM. *Becario de CONACYT-DGAPA

CARACTERIZACION FUNCIONAL DE DISTINTOS COMPONENTES DEL MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO DE PACIENTES CON SINDROME MIELODISPLASICO.

Flores-Figueroa E*, Gutiérrez G*, Pizzuto J*, Mayani H*. Laboratorio de Hematopoyesis, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas*, Servicio de Hematología, Hospital de Especialidades*, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F.

Se ha demostrado que en el microambiente hematopoyético (MH) de los pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD) existe una sobreproducción de citocinas inhibitorias, una disminución en la secreción de citocinas estimuladoras y un incremento en la apoptosis. Sin embargo estos estudios se han realizado en biopsias y capas de estroma totales, por lo que no ha sido posible distinguir qué elemento o elementos del microambiente se encuentran alterados, y si esa alteración se debe a la influencia de algún otro factor. Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue el trabajar con poblaciones enriquecidas y aisladas de los componentes más abundantes del MH (fibroblastos (representan la fracción no hematopoyética) y macrófagos (derivan de la fracción hematopoyética)) y estudiar su funcionalidad. Se obtuvieron aspirados de médula ósea tanto de pacientes (17) como de médula ósea normal (MON) (14). Se separaron por adherencia las fracciones de fibroblastos y macrófagos (el grado de pureza fue superior al 85%) y se evaluaron: los niveles de las citocinas (mediante la técnica de ELISA), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), e interleucina 6 (IL-6); los niveles de apoptosis (TUNEL) y se valoró el efecto del medio condicionado de estas subpoblaciones sobre progenitores hematopoyéticos (cultivos semisólidos de metilcelulosa). También se midió la proliferación de fibroblastos (por incorporación de bromodeoxi-uridina) y se evaluó su número de progenitores (cultivo líquido). No se encontró diferencia en el crecimiento de fibroblastos, ya que el número de progenitores y su cinética de proliferación fue semejante al de médula ósea normal. Tampoco se encontró una diferencia en los niveles de apoptosis en macrófagos y fibroblastos aislados de pacientes y MON. Los macrófagos de pacientes no producen más TNF α ni IL-6 cuando se encuentran aislados, sin embargo su medio condicionado inhibe el crecimiento de progenitores normales. Los fibroblastos de pacientes producen una mayor cantidad de IL-6 y a diferencia de los fibroblastos normales, éstos producen TNF α . Los resultados sugieren que en pacientes con SMD, la población de fibroblastos se encuentra alterada. Es necesario realizar estudios para establecer la causa de dicha alteración; una posibilidad es que los fibroblastos provengan de la clona maligna, o bien, que se encuentren infectados por algún tipo de virus.

HEMATOPOYESIS

PROLIFERACION Y EXPANSION *in vitro* DE CELULAS CD34+ DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL EN RESPUESTA A DISTINTAS COMBINACIONES DE CITOCINAS.

Flores-Guzmán, P., Mayani, H. Laboratorio de Hematopoyesis, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México D.F.

El estudio de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de la sangre de cordón umbilical (SCU) ha adquirido gran relevancia durante los últimos años, debido a la creciente aplicación que se les ha dado en la clínica. En el presente trabajo, analizamos la cinética de proliferación y expansión de dichas células en cultivos líquidos a largo plazo, en ausencia de estroma y en presencia de diferentes combinaciones de citocinas recombinantes. Utilizando un sistema inmunomagnético, obtuvimos poblaciones enriquecidas en células CD34+, las cuales fueron cultivadas bajo cinco condiciones distintas: a) en ausencia de citocinas recombinantes, b) en presencia de SCF + IL-6 (cocktel básico), c) en presencia de SCF+IL-6+GM-CSF+G-CSF (cocktel mielóide), d) SCF+IL-6+IL-3+EPO (cocktel eritroide) y e) las seis citocinas juntas (cocktel mixto). En ausencia de citocinas, las CPH fueron incapaces de proliferar, decreciendo en cantidad hasta un 10% del número inicial después de 20 días de cultivo. En presencia del cocktail básico, se observó una ligera proliferación (incremento de 4 veces al día 20); sin embargo, no se observó expansión de CPH. En presencia del cocktail mielóide se observó un incremento de 280 veces en el número total de células (día 20) y un incremento de 7.5 veces en el número de CPH (día 10). En presencia del cocktail eritroide, el incremento máximo en el número celular también fue de 200 veces (día 15), sin embargo, no se observó expansión de CPH en el día 10 de cultivo. Finalmente, en presencia del cocktail mixto, nuevamente se observó un incremento de 200 veces en el número total de células, aunque la expansión de CPH fue reducida (1.7 veces al día 10). Nuestros resultados indican que, si bien los cocktails mielóide, eritroide y mixto favorecen en igual magnitud la proliferación de las CPH de SCU, el primero de ellos es el que favorece en mayor medida la expansión de dichas células. Futuros estudios incluirán a las citocinas TPO y FL para explorar la posibilidad de una mayor expansión de CPH.

IDENTIFICACION DE ALTERACIONES DEL GEN *CBF* [CORE BINDING FACTOR] EN PACIENTES CON LMA

¹Irigoyen M., ¹Arana RM., ²Rubio ME., ³Báez E., ⁴Garces O., ⁵Duque J., ⁶Gómez E., ⁷Castro MA., ⁸Camacho A., ⁹Ruiz E., ³Villarreal G., ⁴Rubio B., ⁶Batista B., ⁶Sánchez E., ¹Falcón E., ³Rico BC., ⁴Delgado J., ⁶Pizzuto J., ³Kofman S., ¹Genética, Hosp Gral Méx. y Fac de Medicina, UNAM. Hematología ²HR#1 GM, México, D.F. ³HR#25, Monterrey, N.L. ⁴HE CMNO, Guadalajara, Jal. ⁵CETS, HG SSA y HG#1, Chihuahua; ⁶HE CMN SXXI, México D.F., ⁷HE#71, Torreón, Coahuila; ⁸HE#1 CMNNO Cd. Obregón, Son. IMSS.

Los *CBF* [core-binding-factor] son factores que activan transcripción y que se asocian con diversos rearrreglos cromosómicos en LMA. La subunidad *CBFα* [o *AML*] está codificada por 3 genes localizados en 6p21; 21q22 y 1p35-36; y la subunidad *CBFβ* mapea en 16q22. Las alteraciones cromosómicas en LMA que afectan estos genes son principalmente t(8,21), inv(16), t(16;16) y del(16q). Estos rearrreglos generan transcritos de fusión con diferentes rupturas en los genes *CBF* que pueden ser detectados por RT-PCR.

OBJETIVO: Identificar los rearrreglos de los genes *CBF* en pacientes con LMA y correlacionar con el diagnóstico y cariotipo. METODOS: Cariotipo en médula ósea por técnica directa y/o cultivos de 72 hrs, con análisis por bandas GTG. Se obtuvo RNA de muestras de médula ósea y/o sangre, por el método de Fenol/Cloroformo/Isotiocianato de Guanidina. Se amplificaron los transcritos de fusión *AML1/ETO* de la t(8,21) y *CBFβ/MYH11* de la inv(16) y t(16;16) por RT-PCR simple y anidada. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio. RESULTADOS: Se estudiaron 19 pacientes con M2 y 14 con M4. Diez casos de M2 tenían t(8,21), 6 de M4 inv(16), 11 cariotipo normal (6 M2 y 5 M4) y en 6 el cariotipo no fue evaluable (3 M2 y 3 M4). En 21/33 pacientes [63.7%] se identificó algún tipo de rearrreglo molecular de *CBF*, que se correlaciona con el diagnóstico y los hallazgos cromosómicos.

INCIDENCIA EN EL TIPO DE REARREGLO MOLECULAR *BCR/ABL* EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

¹Falcón E., ¹Ruiz E., ²Báez E., ³Garces O., ⁴Ignacio G., ⁵Gómez E., ⁶Madrid V., ⁷Herrera P., ⁸Delgado J., ⁴Rubio ME., ⁹Pizzuto J., ²Rico BC., ³Rodríguez-Carrillo J., ⁴Ovilla R., ¹Arana RM., ¹Kofman S., ¹Genética, Hospital General de México y Facultad de Medicina, UNAM. México D.F. Hematología ²Hospital Regional #25, Monterrey, N.L. ³Hospital de Especialidades CMNO, Guadalajara, Jal. ⁴Hospital Regional #1 Gabriel Mancera, México, D.F. ⁵Hospital de Especialidades, CMN SXXI, México D.F. IMSS.

La translocación recíproca t(9;22)(q34.1;q11.2) presente en los pacientes con leucemia mielóide crónica (LMC) fusiona los genes *ABL* en 9q34 con *BCR* en 22q11, generando un gen fusionado *BCR/ABL* y una proteína quimérica [P210]. Dependiendo de donde ocurra la ruptura en *BCR* se generan dos diferentes tipos de transcritos principalmente *b2a2* y *b3a2*. La incidencia de uno u otro rearrreglo varía en las diferentes series reportadas; siendo más frecuente el tipo *b3a2* (67%).

OBJETIVO: Determinar la incidencia del rearrreglo *BCR/ABL* en médula ósea de 144 pacientes con LMC en fase crónica *de novo*. METODOS: Se realizó extracción de RNA de médula ósea y se amplificó el rearrreglo *BCR/ABL* por RT-PCR anidada. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio. RESULTADOS y DISCUSION: Todos los casos fueron positivos para algún tipo de rearrreglo *BCR/ABL*, en 100 pacientes (69.4%) fue del tipo *b2a2* de 385pb, en 38 (26.4%) fue del tipo *b3a2* con 425pb y en 6 casos (4.2%) se presentaron ambos rearrreglos [*b3a2-b2a2*]. Se observó una mayor incidencia del rearrreglo tipo *b2a2* esta diferencia observada en la distribución de los transcritos comparada con la literatura podría ser por los diversos métodos empleados, sin embargo no podemos descartar diferencias étnicas.

CROMOSOMA FILADELFIA Y REARREGLO MOLECULAR *BCR/ABL* EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA

¹Ruiz E., ¹Arana RM., ²Gómez E., ³Rubio ME., ⁴Castro MA., ¹Falcón E., ²Sánchez E., ¹Madrid V., ²Pizzuto J., ¹Kofman S., ¹Genética, Hospital General de México y Facultad de Medicina, UNAM. Hematología ²Hosp de Especialidades, CMN SXXI, ³Hosp Regional #1 Gabriel Mancera, México, D.F. ⁴Hosp de Especialidades #71, Torreón, Coahuila; IMSS.

Se ha informado que aproximadamente 1% de las LMA presentan t(9;22)(q34;q11). A nivel molecular se reporta que expresan la proteína P190 producto del gen fusionado *BCR/ABL*, sin embargo como su frecuencia es baja no hay datos concluyentes. No se descarta que expresen la P210 del rearrreglo *BCR/ABL* característico de la LMC o bien otras variantes como P230. OBJETIVO: Determinar el tipo de rearrreglo molecular *BCR/ABL* en médula ósea de 4 pacientes con LMA *de novo* y cromosoma Filadelfia positivo. METODOS: Se realizó cariotipo en médula ósea y se analizó con bandejo GTG. Se extrajo RNA y se amplificó el rearrreglo *BCR/ABL* por RT-PCR anidada. Se usaron secuencias de amplificación para los dos principales transcritos de P210 *b3a2* y *b2a2*, para el rearrreglo *e1a2* de P190 y *e19a2* de P230. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio. RESULTADOS y DISCUSION: Los pacientes fueron 3 masculinos y un femenino de 17 a 54 años con diagnóstico de M2 (2 casos), M1 y M7. En el cariotipo todos los pacientes presentaron metafases normales y células con t(9;22) en igual proporción y un caso tenía además metafases hiperdiploides (>50 cromosomas). En el estudio molecular todos los casos fueron positivos para el rearrreglo *e1a2* de P190 *BCR/ABL*. La paciente con M7 presentó además del rearrreglo *e1a2* un transcrito del tipo *b2a2* correspondiente a P210. La co-expresión de estos dos rearrreglos puede ser originada por procesamiento alternativo [splicing]. Se correlacionan estos hallazgos con las características clínicas de los pacientes.