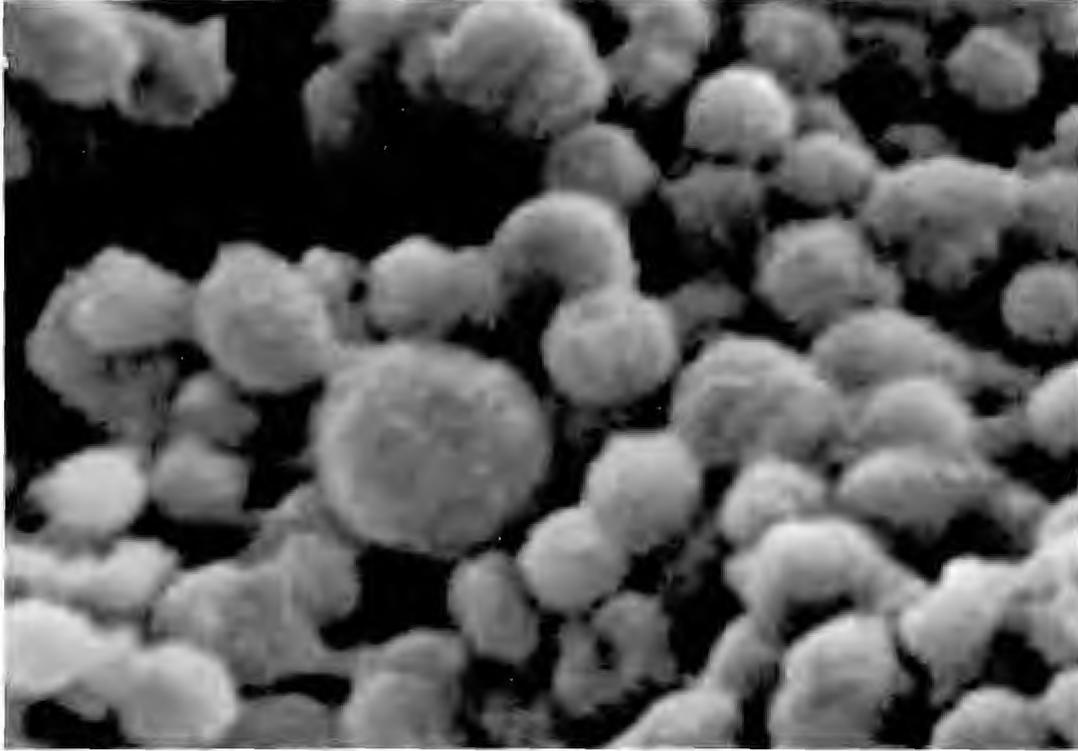


**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, NATURALES Y AGRIMENSURA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE**



**APOPTOSIS EN MEDULA OSEA; EXPRESION DE Bax, Bcl-xL y EPO-R  
DURANTE LA RECUPERACION MEDULAR INJURIADA POR UNA  
UNICA DOSIS DE CICLOFOSFAMIDA**

**TESISTA: JULIAN JUARISTI  
DIRECTOR: DR CARLOS BOZZINI  
CO-DIRECTOR: DRA NORA BRANDAN**

**A Mirta Alvarez, Maria Victoria Aguirre  
y Nora Brandan, por el tiempo y el trabajo  
compartido.**

**Agradecimientos**

**Al Dr. Joaquín Espada que me dio entrada a su laboratorio  
Al Dr. Carlos Bozzini por el prolongado y sostenido apoyo a este laboratorio.  
Al Dr. José María Trifaró por su generosidad intelectual y material  
A la Facultad de Medicina de la UNNE que me sostuvo estos años.**

## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES GENERALES. LAHEMATOPOYESIS .....</b>	<b>5</b>
<b>LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS .....</b>	<b>7</b>
<b>EL MICROAMBIENTE .....</b>	<b>9</b>
<b>LA TRANSDUCCION DE SEÑALES .....</b>	<b>12</b>
<b>ERITROPOYESIS-ERITROPOYETINA-EPO-R .....</b>	<b>14</b>
<b>LA HOMEOSTASIA TISULAR .....</b>	<b>17</b>
<b>a) Apoptosis .....</b>	<b>19</b>
<b>b) Proliferación y Diferenciación .....</b>	<b>20</b>
<b>LA MEDULA OSEA .....</b>	<b>23</b>
<b>LA CICLOFOSFAMIDA .....</b>	<b>28</b>
<b>ANTECEDENTES ESPECIFICOS .....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>79</b>

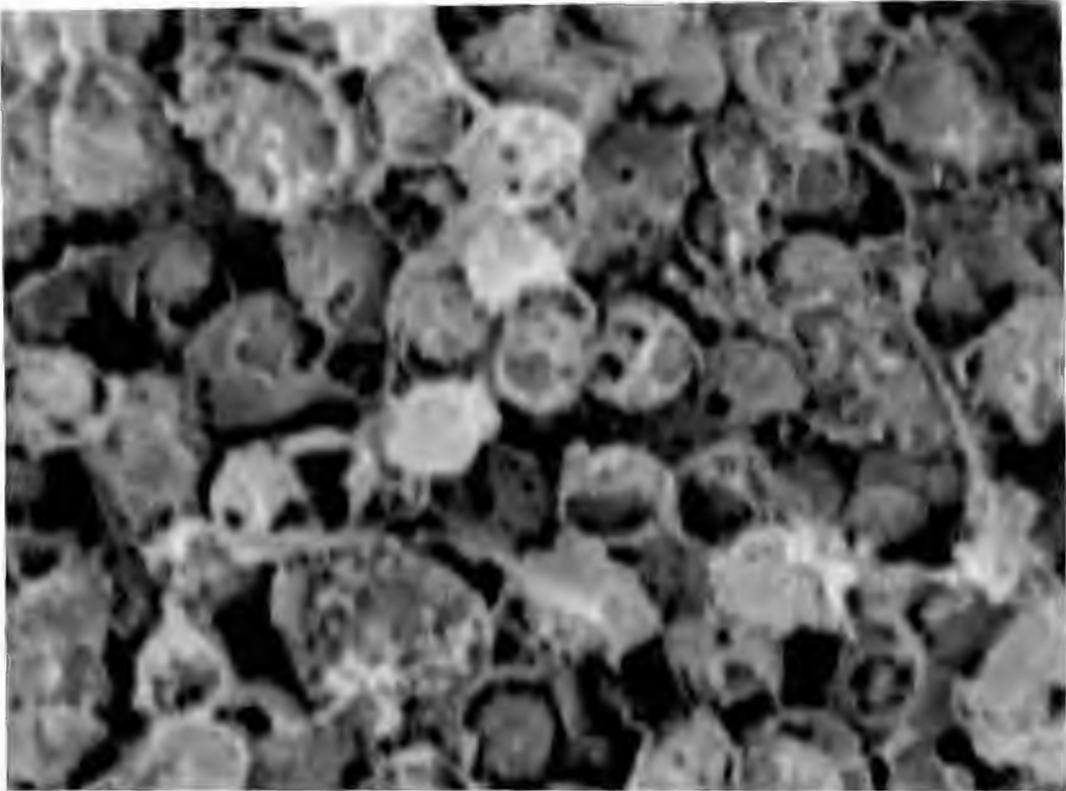
## RESUMEN

Los mecanismos por los cuales en médula ósea (M.O.), una célula autorrenovable, prolifera, se compromete en un linaje y se diferencia, son todavía pobremente comprendidos. Se acepta que una intrincada red de citoquinas, factores de crecimiento, etc, actuando en forma sinérgica, redundante, pleiotrópica y hasta antagónica, regulan estos procesos, conformando un sistema de interacciones azarosamente interferidas que han dado en llamarse “cross-talk”. Cuando el sistema es perturbado, por ejemplo por acción de citóxicos, los progenitores celulares son reclutados de su estado de quiescencia, se induce la liberación de nuevas citoquinas, se incrementa la apoptosis y/o la proliferación. Es decir se instala un nuevo cross-talk destinado a reestablecer la homeostasia tisular.

Nosotros analizamos este proceso, observando el efecto de una simple dosis de ciclofosfamida (CPA, 150 mg / kg i.p.) sobre la hematopoyesis, en particular sobre el compartimento eritroide, durante 10 días después de la injuria. Se instrumentaron varios métodos experimentales: se cuantificó la celularidad total y diferencial, se determinó la apoptosis por la técnica TUNEL, se observó la arquitectura de la M.O. por microscopía electrónica de barrido, se cuantificó la proliferación celular por la incorporación de tritio al ADN, la diferenciación de progenitores en medio semisólido (CFU-E y BFU-E). Además, se evaluó la variación en la expresión de proteínas vinculadas al compromiso y la sobrevivencia eritroide por inmunoblottings; concretamente, el receptor de eritropoyetina (EPO-R), Bcl-xL y Bax, que fueron estudiados los días 0,1,2,3,4,5,6,7 y 10, después de la injuria citotóxica. A fin de analizar la variación de la respuesta de M.O. a eritropoyetina (EPO), la mayoría de las experiencias fueron realizadas comparando su recuperación espontánea con la de células estimuladas “ex vivo” con eritropoyetina recombinante humana (EPO).

La eritropoyesis fue particularmente afectada por la CPA. Máxima apoptosis, mínima celularidad y una severa alteración del nicho medular son observables al segundo día pos CPA. Durante la recuperación espontánea, la expresión de EPO-R es observable al cuarto y quinto día. En las células estimuladas "ex vivo" con EPO (2 U/ml), EPO-R está sobrepresado a lo largo de todo el estudio, excepto entre el primero y el cuarto día. Bax fue observable a lo largo de toda la experiencia, con y sin estimulación con EPO. Mientras Bcl-xL, indetectable sin estimulación, su expresión se muestra gradualmente incrementada a partir del quinto día y hasta el fin de la experiencia, cuando las células son estimuladas. Estos resultados muestran una drástica reducción de la actividad hematopoyética inmediatamente después de la injuria, seguido por una recuperación de la capacidad proliferativa del linaje eritroide EPO dependiente, entre el cuarto y el quinto día, con la posterior recuperación de las colonias de progenitores BFU-E y CFU-E a partir del sexto y séptimo día respectivamente.

Estos hallazgos sugieren que la recuperación de la MO después de la injuria inducida por CPA, pone en marcha un sistema autorregulado, capaz de reducir fuertemente la proliferación celular mientras persiste la noxa, preservando así, el pool de células hematopoyéticas multipotentes. Una vez que el tóxico ha sido metabolizado, se acelera la recuperación hematopoyética. La evidencia experimental parece mostrar que tras el estrés hematopoyético provocado por el citotóxico, en la recuperación del compartimento eritroide, el proceso está regulado, fundamentalmente, por la expresión de EPO-R.



## **ANTECEDENTES GENERALES**

## **LA HEMATOPOYESIS.**

En la sangre periférica, las células sanguíneas se presentan, en condiciones fisiológicas en número y proporciones constantes. Esto se logra por un delicado equilibrio entre una continua pérdida de células envejecidas y el ingreso de nuevas células (mieloides, eritroides y linfoides), generadas a partir de una pequeña población de células madres o stem cells (S.C.) ubicadas en la médula ósea (M.O.) (Metcalf D., 2001) Se trata de un sistema altamente regulado, de modo tal, que linajes específicos pueden modificar significativamente su tasa de proliferación y diferenciación, aumentando selectivamente su número y adaptando el organismo a desafíos tales como la hipoxia, la hemorragia, la infección, o aún a situaciones de estrés hematopoyéticos, tales como la ablación de la MO por agentes citotóxicos. (Lemischka I 2001; Jordan y col. 2000)

En esta regulación participan pequeños péptidos y hormonas glicoproteicas. Esto incluye la Eritropoyetina (EPO), la Trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento de la línea mieloide, conocidos por las siglas GM-CSF, G-CSF y M-CSF, además de varias interleuquinas, que no solo participan en la regulación linfoide, sino que también modulan la línea mieloide. Estas moléculas se reúnen bajo el nombre común de citoquinas (Erslev, A. y col., 1985; Metcalf y col. 1995)

Muchos de los genes que codifican estos factores han sido aislados, clonados e incluso, algunos de sus productos recombinados, están disponibles para su uso terapéutico.

Normalmente durante la infancia y la vida adulta, la MO es el único sitio productor de células sanguíneas. Si bien proliferan y se diferencian en el espacio extravascular, a medida que maduran las células son liberadas a la microcirculación medular y posteriormente a la circulación general. Mientras en el infante toda la M.O. es hematopoyética, con el tiempo es progresivamente ocupada por tejido graso, particularmente en los huesos largos, de modo que en el adulto, el tejido hematopoyético está confinado a los huesos medios y a los

extremos proximales del fémur y el húmero. Incluso en estas áreas, aproximadamente el 50% de la M.O. consiste en grasa, aunque esta pueda revertirse hacia la hematopoyesis. En situaciones patológicas, el hígado y el bazo pueden reasumir el rol hematopoyético que tuvieron durante la embriogénesis (Zanjani y col., 1993)

### **LAS CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS**

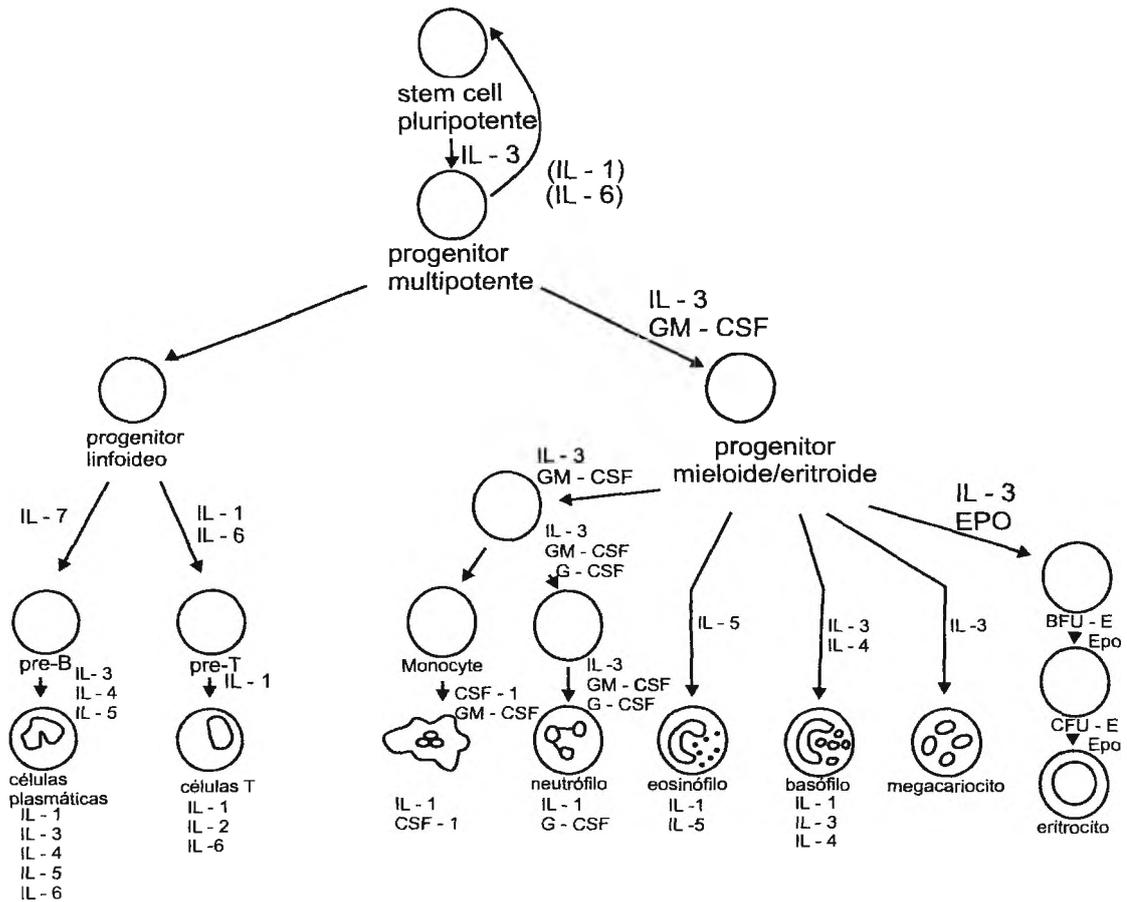
Aunque el exacto fenotipo del S.C. es desconocido, en la práctica clínica se reconoce como tal, a una célula con la apariencia de un linfocito pequeño, que inmunofenotípicamente es CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, y además, negativo para cualquier marcador de línea. (Spangrude G.J. y col., 1998; Fraser C.C. y col., 1992)

Un rasgo que caracteriza a esta célula, es su plasticidad. Existe una evidencia creciente que en diferentes tejidos adultos, persisten células pluripotentes, capaces de generar varios tipos tisulares. La M.O. contiene un S.C. del que normalmente se originan el sistema linfoide y el mielo-eritroide, sin embargo, en determinadas condiciones, este SC puede diferenciarse a miocito, osteoblasto, células del endotelio vascular, células grasas y tejidos fibroso (Dominici M. y col., 2004). Se acepta entonces, que estas células conservan un rasgo típico de las células embrionarias de los vertebrados y que es su plasticidad para responder a los procesos inductivos. Esto refuerza la analogía entre hematopoyesis y embriogénesis. De hecho, De Robertis describe la hematopoyesis como la persistencia de un estado embrionario en el adulto

Las técnicas de cultivo "in vitro", han mostrado la existencia de progenitores hematopoyéticos que en sucesivas divisiones, van restringiendo sus posibles opciones. De manera que la diferenciación celular, a partir de la célula madre y hacia los distintos linajes, implica la sucesión de un conjunto ordenado jerárquicamente de progenitores pluripotentes (CFU-GEMM, unidades formadoras de colonias granulocíticas, eritroides, monocitos, macrófagos), bipotentes (CFU-GM, unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago) o

monolínea (BFU-E, unidades formadoras de burst eritroideos) hasta llegar a la diferenciación terminal. (Bradley T y Metcalf D, 1966; Iscove N.N. y col., 1972). Cuando esto ocurre, se dice que las células han alcanzado su potencial evolutivo. La hematopoyesis se representa esquemáticamente en la siguiente figura.

### LA HEMATOPOYESIS



La hematopoyesis tal como ha sido descrita por Metcalf y Nicola, mostrando los caminos de diferenciación linfocítica, mieloide y eritroide, junto a la interacción de las citoquinas con las células en tránsito. A partir de un HSC y tras sucesivas divisiones, 8 tipos celulares distintos entran diariamente al torrente sanguíneo. La diferenciación de los distintos linajes, implica la sucesión de un conjunto ordenado de progenitores pluripotentes (GEMM), bipotentes (GM) o ya comprometidos con un linaje. (BFU-E)

Variando las condiciones de cultivo, puede discriminarse progenitores tempranos, de otros más tardíos. Los BFU-E son un ejemplo de los primeros, los CFU-E (unidades formadoras de colonias eritroides), de los segundos.

A pesar de esta continua producción de células hematopoyéticas, la celularidad medular total, permanece constante y en condiciones de estado estacionario. Sin embargo, el sistema implica un considerable proceso de amplificación. Una sola célula madre es capaz de producir  $10^6$  células sanguíneas maduras después de 20 divisiones celulares. Además, las células precursoras son también capaces de proliferar respondiendo a factores de crecimiento, expandiendo una u otra línea, según lo requiera la necesidad del organismo. (Cheshier S.H, y col. 1999)

## EL MICROAMBIENTE

La M.O. forma el microambiente óptimo para el crecimiento y desarrollo del S.C.. Esto se hace evidente, por el hecho que administradas en forma endovenosa durante los trasplantes, espontáneamente, estas células se instalan y proliferan en ella. Este microambiente está formado por células estromales y una red microvascular. Esto incluye adipocitos, fibroblastos, células reticulares, células endoteliales y macrófagos. Todas ellas secretan moléculas extracelulares tales como colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, que conforman la matriz extracelular. Estas células estromales, participan además, en la producción de los "factores de crecimiento" necesarios para la sobrevivencia de los progenitores. (Majka y col., 2001)

Los factores de crecimiento son moléculas de naturaleza glicoproteicas y comportamiento esencialmente autócrino y/o parácrino, que regulan la proliferación y la diferenciación celular. Sus efectos biológicos son mediados a través de receptores específicos ubicados sobre la membrana de la célula blanco. Pueden actuar localmente, sobre la misma célula productora, sobre células vecinas, por contacto célula-célula o circular en el plasma. También pueden unirse

a la matriz extracelular para formar nichos específicos en los que se adhieren los progenitores.

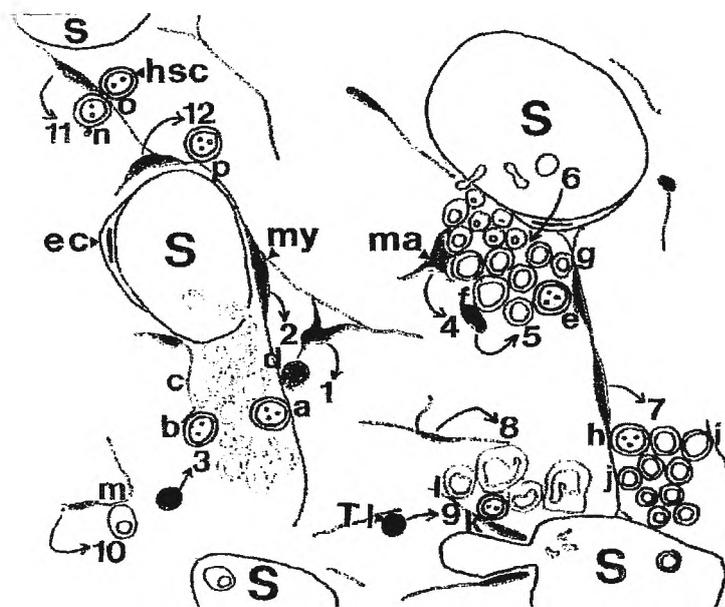
Además de las células estromales, los linfocitos, los macrófagos y todos los progenitores en tránsito, son importantes productores de factores de crecimiento. Células y factores conforman así, una compleja red de interacciones, donde los mismos elementos que se diferencian, participan en su regulación. (Janowska-Wieczorek A. 2001)

Por otro lado, EPO y TPO (trombopoyetina), aunque también son producidas "in situ", son mayoritariamente sintetizadas en el riñón y el hígado respectivamente y transportadas por vía sanguínea. (Erslev A.J., 1953; Erslev A.J., y col.; 1985) Agregando a la regulación endógena de la MO., un circuito de regulación exógena.

Una importante característica del modo de acción de los factores de crecimiento es la variedad de sus interacciones. Dos o mas factores pueden actuar sinérgicamente estimulando a una célula en particular a proliferar o diferenciarse. Además, un factor actuando sobre una célula, puede estimular la producción de otro factor o un receptor, modificando la respuesta definitiva o la sensibilidad celular. La IL-3 y el GM-CSF, por ejemplo, son factores de crecimiento multipotentes (pleiotrópicos), con actividades que se solapan. Factores como el S.C. factor, el Flt-L, IL-3 y GM-CSF son necesarios para la sobrevivencia de las células hematopoyéticas tempranas. Juntos, estos factores sostienen una población de S.C. y otras células progenitoras. Sobre estas, tardíamente actuaran factores como EPO, G-CSF, M-CSF, IL-5 (factor de crecimiento eosinófilo) o TPO, estimulando la expansión de uno u otro linaje celular en respuesta a las necesidades orgánicas ( infecciones, hemorragias o hipoxia). Se ha probado que estos factores participan en la proliferación celular, pero también en la diferenciación y la maduración, así como en la prevención de la apoptosis o en el funcionamiento de las células maduras. (Koury M.J., y col. 1990; Kelley L.L.; 1993).

Otro elemento característico del microambiente es la gran familia de moléculas glicoprotéicas llamadas moléculas de adhesión. Fijan los precursores medulares a varios componentes de las matriz extracelular, al endotelio, a otras superficies y unas a otras.

### EL MICROAMBIENTE



Esquema que muestra las interacciones celulares y la producción de citoquinas en el microambiente de MO. Sinusoides (S) con células endoteliales (ec) , y S.C. hematopoyético (hsc), células redondas con un gran núcleo y dos o tres nucleolos. Miocitos (my) con largos procesos citoplasmáticos, macrófagos (ma), linfocitos T (T-1). Las células restantes representan clones de granulocitos, eritroblastos, megacariocitos y linfocitos B.

Las citoquinas, según su origen, son indicadas por una flecha. Desde el macrófago: (1) IL-1, TNF $\alpha$ ; (4) activina. Desde los miocitos: (2) M-CSF, G-CSF, GM-CSF, IL-6; (5) SCF, IGF-1; (7) IL-7, SCF, FL, IL-6; (8) Tpo, IL-6; (10) IL-6; (11) LIF, SDF-1; (12) TGF $\beta$ , IL-8. Desde el linfocito T: (3) IL-3; (9) IL-3. Desde el plasma: (6) EPO.

El tipo de interrelaciones entre las células (hsc u otras) están indicadas por letras: a) célula-célula, (hsc-hsc); b) Fibronectina entre hsc; c) Colageno I, precursores granulocíticos; d) M-CSF  $\beta$ , monocitos macrófagos; e) SCF, hsc; f) VCAM-1, precursores eritroides; g) Fibronectina; precursores eritroides; h) flt3, hsc; i) Fibronectina, células Pre B; j) VCAM-1 células pre B; k) SCF, hsc; l) TSP megacariocito precursor, m) VCAM-1, plasmocito; n) ácido hialurónico, hsc (marcados con puntos negros); hep, hsc; o) Fibronectina, hsc; p) fosfatidil inositol unido a proteína, hsc. (Charbord, 2001 b).

Se distinguen 3 grupos principales de moléculas. 1) La superfamilia de las inmunoglobulinas. Estas incluyen a receptores capaces de reaccionar con antígenos (los receptores de las células T y las inmunoglobulinas) y moléculas de superficie de adhesión antígeno independiente. 2) Las selectinas, moléculas principalmente comprometidas con la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio, durante los procesos inflamatorios y la coagulación. 3) Las integrinas, fundamentalmente comprometidas en la adhesión celular a la matriz extracelular, v.g. el colágeno.

Las moléculas de adhesión son fundamentales para determinar si las células permanecerán fijas o entrarán al torrente sanguíneo; además, participan en el desarrollo y el mantenimiento de la respuesta inflamatoria. Su expresión puede ser modificada por factores extra e intra celulares y la alteración de su expresión puede ser cuantitativa o funcional. (Lemischka I, 1997; 2001)

#### **LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.**

Las citoquinas se unen con alta afinidad a los receptores de sus células blanco. La mayoría de estos, pertenecen a un conjunto de glicoproteínas de membranas, estructuralmente relacionadas.

Se diferencian varias familias de receptores: la familia de Receptores Tiroquinasa, la familia de Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), la familia del Receptor del Factor de Crecimiento Transformante (TGF), la familia del Receptor de Chemoquinas y los Receptores de citoquinas clase I y clase II.

La familia del Receptor de clase I, conocidos como receptores hematopoyéticos, incluye a la mayoría de los receptores para interleuquinas y factores estimulantes de colonias. Por otro lado; los receptores de clase II, la familia del Receptor del Interferon, están relacionados estructural y funcionalmente a los de clase I. Los miembros de ambos grupos presentan rasgos similares; fibronectina en su dominio extracelular y un conservado motivo, conocido como Box I, en su dominio citoplasmático.

Se diferencian en cambio por el orden de los conservados residuos de cisteína y por un motivo único y característico, en el dominio extracelular del de clase I. (Takahiko Hara y col., 2000)

El dominio intracelular de los receptores, está asociado con miembros de una familia de proteínas específicas con actividad tirosin kinasa, la familia de las Janus kinasas (JAKs). Cuando un Factor de crecimiento se une a sus receptores, estos se agregan.

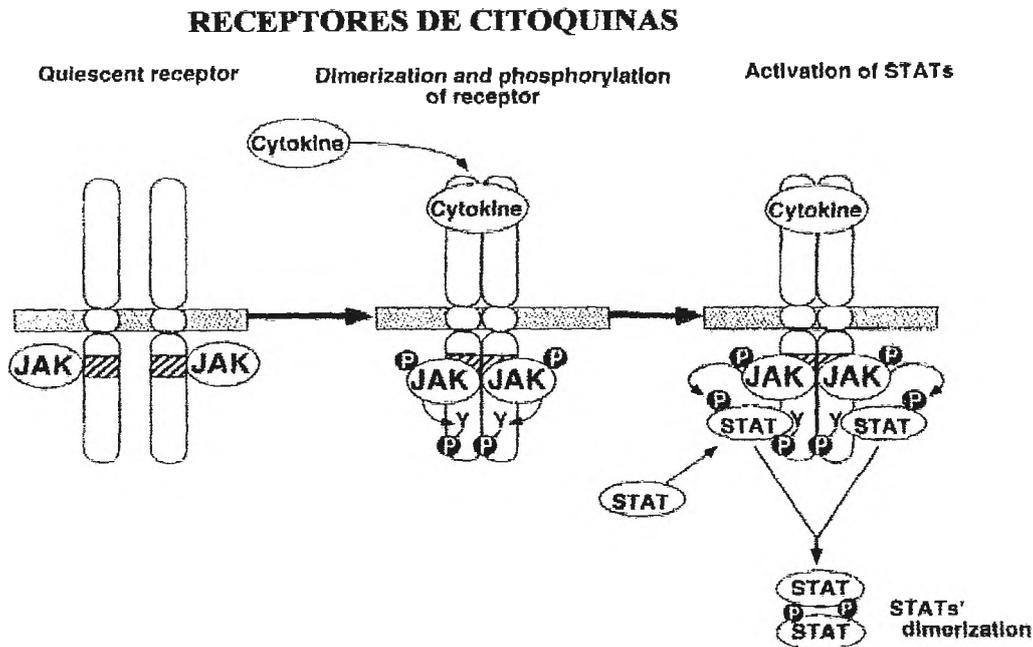
Esta agregación induce la activación de las JAKs, las que fosforilan los miembros de un grupo de proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STATs). A la fosforilación de las STATs sigue su dimerización y su translocación al núcleo celular. Allí, las STATs, activan la transcripción de genes específicos. De esta manera, vía JAK/STAT, los factores de crecimiento regulan la función de las células mieloides, eritroides y linfoides, controlando la expresión de genes específicos. (Fukada T, y col. 1998)

Por otro lado, la activación de JAK también puede inducir la proliferación celular. La activación de las Mitógeno Activada Proteína Kinasa (MAPKs) via RAS/RAF proteína kinasa, incrementan la expresión de un conjunto de factores de transcripción, incluyendo MYC y FOS, cruciales en las señales de proliferación.

Los factores de crecimiento también promueven la sobrevivencia celular por bloqueo de la apoptosis. La activación via JAK de la proteína kinasa B y la consecuente fosforilación de la proteína pro-apoptótica BAD, pueden mediar como señal antiapoptótica. Al parecer, mediados por el mismo factor de crecimiento, diferentes dominios del receptor intracelular pueden determinar distintos procesos, vg, la proliferación o la supresión de la apoptosis. (Starr R. y col., 1997)

Esto es común a varios factores de crecimiento, incluyendo el S.C. factors (SCF) y el M-CSF, también capaces de regular la expresión génica por auto fosforilación de los residuos de tirosina de su receptor. Esto genera la compleja cascada de eventos que terminan con cambios en la proliferación celular o en apoptosis.

La siguiente figura muestra el esquema general de la activación la vía JAK/STAT por citoquinas.



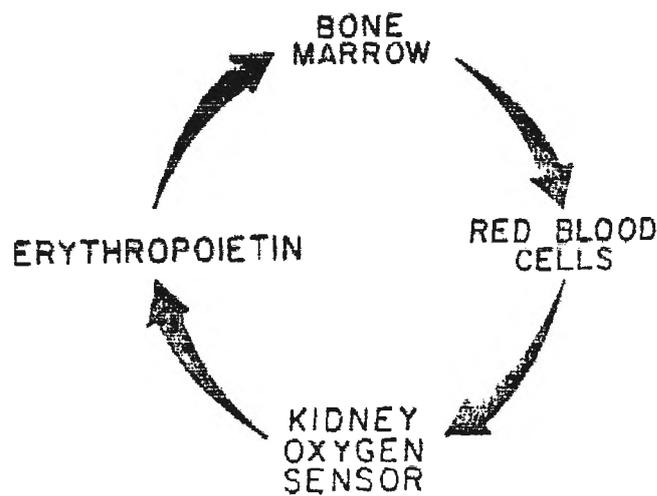
Un esquema general de receptores de citoquinas. La unión del ligando implica su agregación, la activación de quinasas (JAK) y la fosforilación de distintos residuos del receptor. Sigue la activación de proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STAT) lo que lleva a la dimerización y su translocación al núcleo.(Gilliam May y Tariq Enver. 2001)

### ERITROPOYESIS – ERITROPOYETINA - EPO-R

La eritropoyesis es parte de la hematopoyesis, ocurre en M.O. e implica una ordenada transición de estadios de células progenitoras; desde los SCH, GEMM BFU-E, CFU-E, precursores como proeritroblastos, basófilos, policromatófilos y ortocromáticos, hasta los reticulocitos y eritrocitos maduros, que son vertidos a la circulación periférica (Erslev A., 1953; Gregory y Eaves 1978; Kelly y col., 1993). Este proceso, es esencialmente regulado por EPO, una glicoproteína de 30 kD, producida por las células peritubulares del riñón y en menor proporción por el hígado (Maxwell y col., 1993; Fisher 2003), capaz de promover la proliferación y diferenciación de las células eritroides. (Koury y col., 1994).

Fisiológicamente la producción de EPO está regulada para mantener una masa óptima de células rojas. Su nivel plasmático basal es de 0.8 - 4 pM/L (5-25 U/L) (Lappin y col., 2002). La disminución de la oxigenación renal resulta en un incremento de la síntesis y la secreción de EPO, que se traduce en estimulación de la eritropoyesis (Wang y Semenza 1996; Ratcliffe P.J., 2002).

### REGULACION DE LA ERITROPOYESIS



Feedback propuesto por Schuster, Caro y Erslev para la regulación de la producción de células rojas por la Eritropoyetina renal y por el cual se mantiene un volumen celular óptimo para la oxigenación tisular. En rigor, es necesario reconocerle una cierta autonomía regulatoria a la MO.; en determinadas condiciones fisiológicas, la proliferación puede independizarse de los títulos de EPO.

Esta hormona, purificada y caracterizada químicamente por Espada y Gutnisky en 1970, fue secuenciada en 1985 y transfectada por Lin y col. en células de ovario de hámster (CHO). Aunque también se usaron otras células, las CHO son la fuente de producción farmacéutica de la eritropoyetina recombinante humana. Desde entonces, ha tenido una amplia aplicación clínica en el tratamiento de pacientes con insuficiencia renal (Eschbach y col., 1990), aplasia medular o en terapia oncológica. En general, la administración de EPO

ha mejorado las condiciones clínicas, reduciendo los requerimientos transfusionales (Rizzo y col., 2002).

EPO-R es un receptor de clase I que se expresa tanto en los progenitores eritroides como en muchos tejidos no hematopoyéticos; miocitos, neuronas, próstata, mama, ovario, etc. Es una proteína de membrana de 507 aa, que comparte características estructurales con receptores para GM-CSF y G-CSF, prolactina, hormona del crecimiento y varias interleuquinas. En la región extracelular, presenta dos dominios tipo fibronectina, capaces de dimerizar al receptor aún en ausencia del ligando. Normalmente, la unión de EPO al receptor genera cambios conformacionales que asocian a JAK 2 y adquiere competencia enzimática.

Los estudios mutagénicos han identificado la función de las distintas regiones que componen el receptor. Los residuos de leucina en posición 240 y 241 son cruciales para su dimerización y la transducción de la señalización corriente abajo, mientras la integridad del dominio transmembrana es necesaria para la orientación y la activación del receptor.

Además, los ratones Knockout, para EPO o EPO-R, han mostrado que aunque el animal muere anémico durante la embriogénesis, el compartimento de progenitores (BFU-E, CFU-E) permanece intacto, mostrando que, si bien EPO o EPO-R son necesarios para la proliferación y la maduración, no lo son para la elección del linaje (Wu y col. 1995) Por otro lado, la pérdida de la expresión de EPO-R en tejido no hematopoyético, muestra ratones normales, lo que indica que letalidad del animal knockout solo es atribuible a la alteración hematopoyética

Aunque los mamíferos presentan 4 JAKs, normalmente, EPO fosforila JAK 2 de manera tiempo y dosis dependiente. Aún conociendo pocas de las proteínas que interactúan con JAK 2 y aunque elucidar sus substratos persiste como una prioridad, es interesante señalar que, dependiendo del residuo de tirosina fosforilado, la actividad de JAK2 puede aumentar o disminuir, lo que muestra que juegan un importante rol en la regulación de la señal de EPO.

El descubrimiento de la vía JAK/STAT ha mejorado la comprensión de los mecanismos de señalización ligados a los receptores de citoquinas.

Se reconoce que varias vías de señalización son activadas simultáneamente por el mismo receptor y a su vez, la misma vía por distintos receptores. La respuesta a estas señalizaciones es variable en extensión y duración para cada molécula y tipo celular. Este “crosstalk” entre los múltiples vías de señalización, es característica de las respuestas a las citoquinas; así, la especificidad del comportamiento celular resulta del efecto combinado de todas las señalizaciones simultáneamente activadas.

Tanto EPO como EPO-R son cruciales para la eritropoyesis dado que controlan la proliferación, la diferenciación y la sobrevivencia de los progenitores tardíos. Sin embargo, respecto a la señalización de EPO-R, todavía hay dificultad para asociar estos eventos con los efectos fisiológicos de EPO. En general, los exactos mecanismos que median entre la unión de la hormona al receptor y la respuesta celular, son todavía pobremente comprendidos. Mientras estudios en varias líneas celulares sugieren que las señales mitóticas son transmitidas por STAT 5, la activación de MAP Kinasas, que están asociadas al efecto antiapoptótico de IL1, GM-CSF, aparentemente no está comprometida en el efecto antiapoptótico de EPO. (David M., y col. 1995)

Por otro lado, si bien la función de EPO-R en relación a la diferenciación celular, está pobremente comprendido; al parecer, la cascada de MAP Kinasas juega un rol en este proceso. EPO induce una caída temprana de la expresión de c-myc, un evento considerado fundamental en la inducción de la diferenciación, al menos en varias líneas de células eritroleucémicas.

Resumiendo, el preciso mecanismo que media entre la unión de la hormona al receptor y los efectos mitogénicos, inhibitorios de la apoptosis o inductores de la diferenciación, son todavía insuficientemente conocidos.

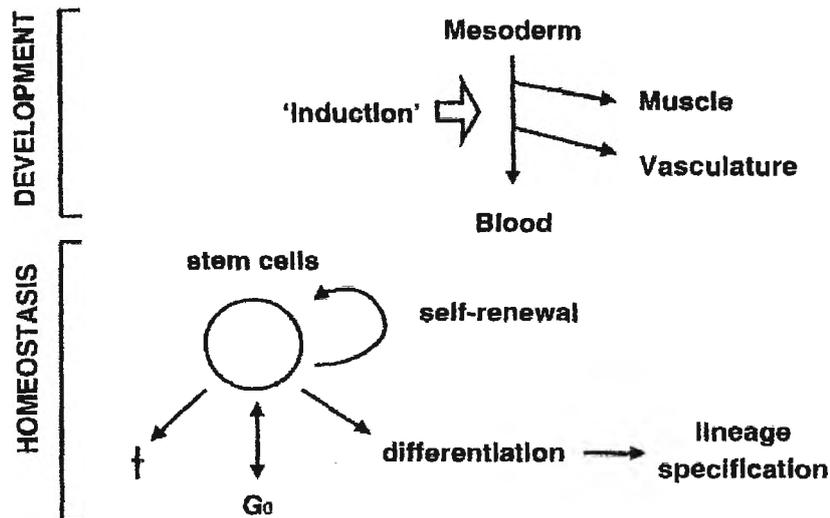
## **LA HOMEOSTASIA TISULAR.**

Existen dos problemas centrales específicamente relacionados al sistema

hematopoyético pero que implican a toda la Biología. El primero se refiere a como el S.C. propio del sistema hematopoyético, se forma durante la ontogenia, sorteando todos los procesos inductivos y persistiendo con una potencialidad propia del estado embrionario.

El segundo, se refiere a como una vez formado, el SC hematopoyético “elige” entre las distintas opciones; autorenovación, quiescencia, apoptosis o diferenciación. Y dado que el SC medular es capaz de diferenciarse, al menos entre 8 o 10 linajes celulares, la especificación del linaje es un componente crítico del camino de la diferenciación. Esto de por sí, muestra la complejidad de la M.O., un sistema en estado estacionario, parcialmente autorregulado y fundamentalmente, adaptativo. Analizamos los principales mecanismos que sostienen la hemostasia tisular

### LA HOMEOSTASIA TISULAR



El esquema resume dos problemas centrales de la hematopoyesis, el primero se refiere al desarrollo del Stem cell a partir del mesodermo; el segundo, al sostenimiento de un estado estacionario y la elección de los posibles destinos para las células hijas. (Gilliam May y Tariq Enver. 2001)

### **a) La apoptosis**

La apoptosis es un proceso fisiológicamente regulado de muerte celular, mediado por proteínas citoplasmáticas. Morfológicamente se caracteriza por un encogimiento celular, formación de ampollas en la membrana, condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo y el clivaje internucleosomal del ADN. (Kroemer y col. 2005)

Es considerado un mecanismo regulatorio fundamental de la homeostasia hematopoyética y la maduración linfocitaria.

La apoptosis resulta de la acción de las caspasas, una familia de cistein-proteasas activadas por clivaje, que lleva a la digestión del ADN por endonucleasas y a la desintegración del esqueleto celular. Hay dos caminos principales por los que las caspasas pueden ser activadas. El primero es a través de proteínas de membranas tales como Fas o el receptor de TNF. Un ejemplo de este mecanismo, lo muestra la célula T citotóxica activada, que expresa el Fas ligando y es capaz de inducir la apoptosis en la célula blanco. El segundo camino es a través de la liberación del citocromo C desde la mitocondria. El citocromo C se une al Apaf-1 que entonces activa las caspasas. El daño en el DNA inducido por radiación o quimioterapia puede actuar a través de este camino.

Así como hay moléculas que activan la apoptosis, hay también otras que la inhiben. El ejemplo mejor caracterizado son las Bcl-2, una familia de proteínas relacionadas, algunas de las cuales son proapoptóticas como Bax y otras antiapoptóticas como Bcl-xL. La relación intracelular entre ambas determina la vulnerabilidad relativa de las células.

La apoptosis es un proceso intenso y normal para las células B sometidas a selección en los centros linfoides germinales. Es más, muchas enfermedades malignas se asocian a una reducción de la tasa de apoptosis, lo que implica una prolongación anómala de la sobrevivencia celular. Un claro ejemplo de esto, es la translocación (8-14) del gen de Bcl-2 al locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina en el centro del linfoma. La sobreexpresión del Bcl-2 maligniza a la célula B, aumentando su resistencia a la apoptosis.

Hay una fuerte evidencia que atribuye un rol central a la mitocondria regulando la apoptosis. Específicamente, un gran número de estímulos tiene a esta organela como blanco, provocando la salida de proteínas incluido el citocromo C. Una vez dentro del citosol, el citocromo se une a una molecula adaptadora, Apaf-1, con la que oligomeriza y activa a la pro-caspasa-9. Esta a su vez, puede activar corriente abajo, a las procaspasas 3 y 7. (Testa, 2004)

La liberación del citocromo C, puede ser influenciada por diferentes miembros de la familia de proteínas Bcl-2, incluyendo pero no limitado, a Bax, Bid, Bcl-xL. Mientras Bax y Bid potencian la liberación del citocromo C, Bcl-2 y Bcl-xl antagonizan estos eventos.

Aunque los toxicólogos, tradicionalmente han asociado la muerte celular con la necrosis, evidencia emergente ha mostrado que diferentes tipos de tóxicos ejercen su actividad, al menos en parte, disparando la apoptosis. Los mecanismos responsables de desencadenar los efectos pro-apoptóticos a partir de un químico dado, son frecuentemente desconocidos, pero en la mayoría de los casos, la mitocondria está comprometida como elemento central del proceso.

#### **b) Proliferación y diferenciación celular.**

En 1974 Lajtha L.G y Schofield R, hicieron un muy detallado análisis de la complejidad conceptual de los términos que definen la diferenciación celular. Y señalaron *“Weiss, en su admirable trabajo, en el primer numero de este Journal, define diferenciación como "un proceso unidireccional e irreversible en la cual se generan verdaderas diferencias constitucionales entre dos generaciones hermanas" . Según Jacob y Monod, el estado de "diferenciación esta presente cuando células con el mismo genoma sintetizan diferentes proteínas" Sin embargo ambas definiciones necesitan ajustes”,* y cuestionaron la irreversibilidad de Weiss, apoyándose en las experiencias de transplante nuclear (Gurdon y Harris), y a los franceses porque veian la necesidad de separar diferenciación de maduración.

Tres décadas después, analizando la bibliografía de referencia, las dificultades persisten. Ocurre que en rigor, hay aquí, un silencioso pero sostenido debate respecto a la autonomía del genoma y la pregunta de fondo es si los llamados factores de crecimiento, ejercen un efecto instructivo o permisivo, en la decisión de las células a diferenciarse hacia una u otra línea. Básicamente hay dos modelos mayoritariamente aceptados, uno estocástico y otro determinístico (Metcalf, D., 1998; Ogawa, M., 1993; Miglaccio, A.R, y Miglaccio G.; 1998)

Para el modelo estocástico, hay un compromiso azaroso con un determinado linaje, mas un mecanismo de selección, representado aquí por los factores de crecimiento, que permitirían o no, la sobrevivencia. Para el modelo determinístico, los factores de crecimiento, actuando como señales externas, dirigen la expresión del genoma moldeando el fenotipo. Evidencia significativa sostiene y contradice a ambos modelos. (Watovich y col., 1996)

La más fuerte evidencia que las citoquinas pueden directamente influenciar en la elección del linaje, viene de los estudios “in vitro” sobre células formadoras de colonias bipotenciales granulocito-macrófago (GM-CFC). Los GM-CFCs desarrollan como granulocitos cuando son cultivados en presencia de S.C. factor (SCF) o G-CSF, y como macrófagos, cuando son cultivados en presencia de M-CSF. Además, por analogía con otros sistemas, como por ejemplo la embriogénesis, no puede dejarse de reconocer la importancia de los fenómenos inductivos externos para determinar el destino celular. No es extraño entonces que autores de incuestionable valor, sostengan que los efectos sinérgicos, redundantes y pleiotrópicos de las citoquinas, son suficientes para explicar en forma determinística la diferenciación celular. (De Haan, D. y col. 1996)

Sin embargo, puede decirse que el modelo estocástico es la explicación más consistente con la teoría biológica mayoritariamente aceptada. Como vimos, según este modelo, el compromiso con un determinado linaje ocurre azarosamente y sin relación con ninguna señal extrínseca. También aquí, una considerable evidencia “in vitro” sostiene la importancia de las citoquinas y los

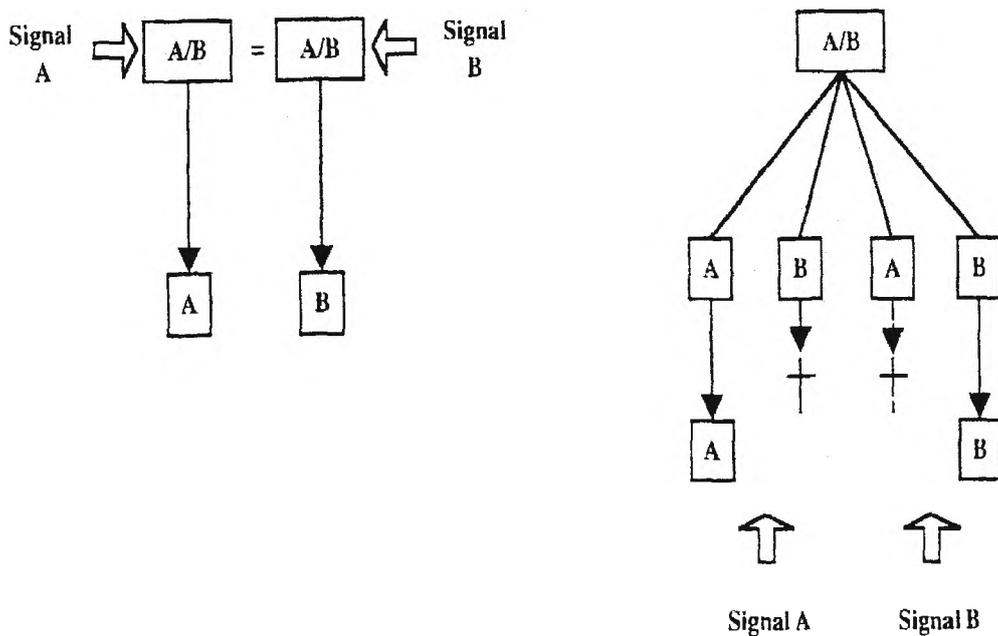
factores de crecimiento para la proliferación y la supervivencia del S.C., así como de su progenie más diferenciada. (Metcalf 1998 a).

Pero además, otras aproximaciones experimentales, han intentado dilucidar si la diferenciación es azarosa o dirigida, por ejemplo, controlando la expresión genética de las citoquinas o sus receptores. En general, el ratón knock-out tanto para citoquinas como para sus receptores, argumenta contra el modelo instructivo. Como ya dijimos, la eritropoyesis de un animal defectivo de EPO o EPO-R, muestra una severa anemia por falta de células maduras. Indicando que EPO y su receptor son necesarios para la diferenciación y la maduración de las células rojas. Sin embargo, examinando el compartimento de progenitores eritroides no se observa un defecto grosero. El compartimento eritroide en sí, sigue intacto.

En forma similar, el ratón knockout para G-CSF, sigue produciendo en forma sustancial progenitores mieloides. Y los animales defectivos de G-CSF, producen, aunque en número menor, neutrófilos. En rigor, el modelo estocástico no es más que una extensión a toda la hematopoyesis de la explicación propuesta por Macfarlane Burnet para la maduración linfocitaria, una fuente azarosa de variación endógena y un sistema selectivo que explica el carácter adaptativo de la respuesta.

Los siguientes esquemas ilustran estos principios. En el primero, células funcionalmente equivalentes, con dos linajes potenciales (A o B), reciben diferentes señales extrínsecas y responden comprometiéndose con un determinado linaje. Los modelos con esta clase de acción atribuida a factores extrínsecos están ampliamente referidos como instructivos. (Socolovsky y col., 1997, 1998) En el segundo, células bipotentes se comprometen estocásticamente con un linaje (A o B). Si las del linaje A reciben las señales apropiadas sobrevive, prolifera y madura. Las células del compartimento B que no son competentes para reconocer tales señales, mueren vía apoptosis.

## LA DIFERENCIACION HEMATOPOYETICA



Esquema mostrando el rol instructivo o estocastico/selectivo de los factores de crecimiento en el compromiso del linaje celular. (Gilliam May y Tariq Enver, Zon, 2001)

### LA MEDULA OSEA

En M.O., distintos clones de células proliferan y se diferencian, apareciendo en la sangre circulante como células rojas, plaquetas y varios tipos de células blancas, en número y proporciones constantes. Las formas tempranas de estos linajes tienen similares características estructurales y no es posible diferenciarlos solo por su morfología. Si bien existen distintas tinciones (May Grünwald Giemsa, Wrigth Giemsa, etc) y con todas ellas se obtienen resultados similares, ninguna es enteramente satisfactoria.

Ocurre que como las células embrionarias, las células hematopoyéticas cambian su forma primitiva al tipo celular maduro, pero estos cambios de las características nucleares y citoplasmáticas, son comunes a todas las células. En general, analizando secuencialmente su maduración, vemos que las células inmaduras son las de mayor tamaño y empequeñecen cuando maduran.

El citoplasma de las células inmaduras es predominantemente azul y contiene grandes cantidades de ARN con una gran afinidad por los colorantes básicos (azul de metileno); luego enrojece progresivamente debido a las estructuras citoplasmáticas y sus productos metabólicos. Los núcleos, al principio grandes en relación con el citoplasma, decrecen a medida que envejecen. Las cadenas de cromatina nuclear, ricas en histonas tienen afinidad por la eosina (acidófilas), luego son más intensamente teñidas y el color cambia de un rojo liviano a un azul oscuro

Pero el más confiable criterio para fijar la maduración celular no es ni el tamaño, ni el color, sino la estructura de la cromatina nuclear. En las células blásticas, las cadenas de cromatina nuclear son claramente visibles. Ninguna parte es más oscura o compacta que otra. A veces el patrón es lineal, otras, hay torsiones cromatínicas que aparecen como gránulos rojos.

Otro signo de inmadurez de la célula sanguínea es la presencia del nucleolo. Este varía en tamaño, número y forma. Su diámetro es usualmente entre 2 y 4 micras, su número varía entre 1 y 4, la forma es redonda u oval y predominantemente azul

Los granulocitos (leucocitos granulares) desarrollan en la MO a partir de una célula indiferenciada llamada mieloblasto. Las células, cuyos gránulos tienen afinidad por los colorantes básicos, son llamados basófilos. Aquellas que se tiñen de rojo naranja son eosinófilos y las células cuyos granulos no se tiñen intensamente con ningún colorante son llamadas neutrófilos. El núcleo de todos ellos cambia progresivamente, de redondo a formas multilobulados, designadas como mielocitos, metamielocitos, en banda y lobulados. (Diggs L.W y col., 1978; Fredrickson, T.N. y Harris, A.W., 2000 )

## LOS PRECURSORES MIELOIDES

Los mieloblastos presentan un citoplasma basófilo, sin gránulos ni vacuolas. El núcleo ovoide, predominantemente rojizo, presenta una cromatina fina con uno o dos nucleolos distinguibles y moderadamente grandes. Dejan de ser blástos cuando desarrollan distintos gránulos. Los primeros gránulos son azul oscuro o azul rojizo

El **promielocito** es la célula más grande de la serie. Estas células son capaces de dividirse, de manera que el tamaño es variable dependiendo del estadio del ciclo celular. El núcleo es redondo u oval y relativamente grande en relación al citoplasma. La cromatina nuclear está más condensada que en el mieloblasto y el nucleolo es menos prominente. Gránulos citoplasmáticos oscuros, redondos, ovalados o irregulares, usualmente entre 10 y 20. Aunque muy variables, identifican este tipo celular. Presentan además, un citoplasma abundante e irregularmente basófilo.

El promielocito se vuelve **mielocito** cuando los gránulos se diferencian de manera que uno los puede identificar como neutrófilos, eosinófilos o basófilos. En el mielocito la forma de rosca del núcleo es más distinguible que en el promielocito, además, ha desaparecido el nucleolo. En los viejos mielocitos, los gránulos oscuros se vuelven menos prominentes y los gránulos neutrofilos predominan. El citoplasma es débilmente basófilo y contiene pocos gránulos específicos

El **metamielocito** es la célula más pequeña entre los mielocitos y muestra numerosos gránulos secundarios sobre un citoplasma pálido. En este estadio, el núcleo en forma de rueda es evidente y las condensaciones basófilas de cromatina están bien definidas .

En los **neutrófilos** en banda hay una mayor condensación, el núcleo en forma de anillo y de tamaño reducido, define este estadio. Los neutrófilos constituyen entre el 5 y el 20% de los leucocitos sanguíneos. Ellos tienen un tamaño uniforme con un extenso y muy pálido citoplasma que contiene un número moderado de gránulos violetas. El núcleo tiene usualmente la forma de

una banda delgada, frecuentemente retorcido sobre si mismo. Pocos neutrófilos en la sangre aparecen abiertos, con núcleos de forma segmentada y multilobulados lo que es usual en las infiltraciones tisulares. En todos los neutrófilos, la cromatina aparece compactada y teñida incluso con un fuerte color violeta.

El mielocito **eosinófilo** tiene rasgos similares a los de los mielocitos neutrófilos, excepto por la presencia de gránulos secundarios eosinófilos y la forma de reloj de arena del núcleo. El metamielocito eosinofilo, presenta un núcleo redondeado, con la cromatina más débilmente teñida que en el metamielocito neutrófilo y con gránulos anaranjados que llenan el citoplasma. En la sangre periférica, los eosinófilos presentan el núcleo en forma de banda con la cromatina menos profundamente teñida que en los neutrófilos. Gránulos grandes, redondos de color marrón rojizo llenan el citoplasma. Los eosinófilos constituyen del 1 al 2% de los leucocitos sanguíneos.

Los **basófilos** presentan el núcleo redondo, irregular, en banda o lobulado; es oscuro y contiene una cromatina débilmente teñida. Los gránulos son oscuros, homogéneamente distribuidos y varían en número, forma, color y tamaño. Los basofilos son extremadamente raros en extendidos sanguíneos normales.

El ratón presenta aproximadamente  $6,7 \times 10^3$  leucocitos/ $\mu\text{l}$  de sangre de los cuales  $6 \times 10^3$  son linfocitos,  $0,6 \times 10^3$  son neutrófilos y entre 0 y  $0,1 \times 10^3$  entre basófilos eosinófilos y monocitos

## **LOS PRECURSORES LINFOIDES**

Los **linfoblastos** presentan un núcleo redondo, con uno o mas nucleolos, la cromatina poco agregada y el citoplasma claramente basófilo. Los linfoblastos presentan numerosos pasos en su diferenciación, indicados por la aparición secuencial de marcadores de superficie. Las distintas subpoblaciones no pueden ser distinguidas morfológicamente, se requiere del inmunomarcado para su identificación.

En la sangre periférica los linfocitos comprenden del 80 al 90% de los leucocitos. Se diferencian: por un lado, los **pequeños linfocitos**, son los numéricamente dominantes, presentan un núcleo homogéneo, rodeado por un borde de citoplasma claro; y por otro, los **grandes linfocitos** con un núcleo ovoide totalmente bordeado por el citoplasma. La azul palidez uniforme del citoplasma es característico de los linfocitos

Los monocitos son los mayores leucocitos circulantes, presentan un citoplasma azul-grisáceo de apariencia cristalina y que puede contener unos pocos gránulos debilmente metacromáticos. Presentan un núcleo lateral y reniforme con un patrón de cromatina característico. Constituyen del 1 al 5% de los leucocitos sanguíneos y son positivos para una estearasa inespecífica y la lizozima. Unos pocos y pequeños gránulos citoplasmáticos se tiñen con mieloperoxidasa.

### **LOS PRECURSORES MEGACARIOCITICOS**

Las formas tempranas de los blastos mononucleares son células más grandes que cualquier otro precursor hematopoyético con un citoplasma fuertemente basófilo y un nucleolo prominente. Los **megacariocitos** maduros son células muy grandes y presentan un núcleo irregularmente lobulado. El citoplasma aparece manchado, conteniendo un número variable de pequeños gránulos rojos o púrpura. El perfil es generalmente redondo u ovoide, aunque pueden aparecer formas más elongadas.

Las **plaquetas** son los elementos mas pequeños de la sangre (trombocitos en la vieja terminología) que perdieron su núcleo. Su número es alto. En la sangre periférica del ratón aparecen alrededor de  $1,6 \times 10^6$  plaquetas/ $\mu$ l.

### **LOS PRECURSORES ERITROIDES**

El **proeritoblasto** es una célula grande que se distingue por una cromatina nuclear más tosca que la de cualquier otra célula blástica y salpicada por áreas intensamente teñidas con eosina. Además, el nucleolo es más grande y

de forma más irregular que el de todos los otros precursores excepto el megacarioblasto. Otro rasgo distintivo es la basofilia de un citoplasma oscuro, homogéneo e igualmente distribuido alrededor del núcleo. Los proeritroblastos, y en forma similar en todos los precursores de la serie, presentan un núcleo y un borde celular redondeado.

**El eritroblasto basófilo**, es una célula de mucho menor tamaño que un proeritroblasto, presenta como rasgo más notable, una cromatina extremadamente condensada contrastando con algunas áreas nucleares eosinófilas. El núcleo está simétricamente rodeado por un citoplasma azul grisáceo.

**Los policromatofilos** presentan la cromatina nuclear basófila, sin áreas eosinófilas en el núcleo. Este núcleo es el más comprimido de todos los precursores y se presenta rodeado por un anillo irregular de citoplasma gris. **Los normoblastos ortocromáticos** son los últimos estadios de diferenciación.

En todos los estadios de diferenciación, las células de la serie eritroide se encuentran asociadas a macrófagos conteniendo restos fagocitados de núcleos expulsados durante la maduración de los precursores.

Normalmente, en un ratón macho adulto de la cepa usada (CCF-1 Swiss) aparecen  $7 \times 10^6$  eritrocitos/ $\mu\text{l}$  de sangre, de los cuales entre el 2 y el 4% son **reticulocitos**. Los eritrocitos aparecen como discos biconcavos de  $5 \mu\text{m}$  de diámetro, en los extendidos se tiñen pálidamente en el área central y más intensamente en los bordes. Los reticulocitos son las formas inmaduras de los eritrocitos, son más grandes, más basófilos y con la palidez central menos marcada. Las organelas citoplasmáticas que todavía no han sido totalmente lisadas pueden observarse como un retículo tiñendo con azul de metileno.

## **LA CICLOFOSFOAMIDA**

Las mostazas nitrogenadas son sustancias análogas al gas mostaza con menor toxicidad que las mostazas sulfuradas lo que permite su uso terapéutico.

La acción terapéutica depende de la existencia de dos grupos alquilo funcionales, unidos a un portador que puede ser de cadena abierta o cerrada, esto da origen a mostazas nitrogenadas: a) alifáticas (Mecloretamina o Clormetina); b) heterocíclicas (Ciclofosfamida); c) aromáticas (Cloranbucilo y Melfalano).

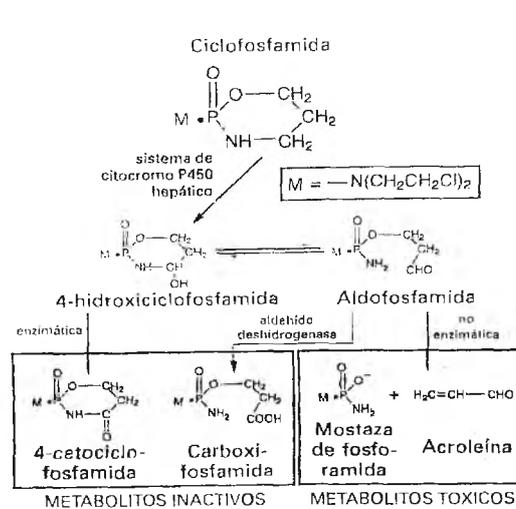
En soluciones acuosas y a pH fisiológico, las mostazas nitrogenadas se ciclizan, dando compuestos de etilenimonio cuaternario que se ionizan. Son las sustancias farmacológicamente activas, el catión formado es muy reactivo y se combina por enlaces covalentes, con proteínas y fundamentalmente, con los ácidos nucleicos. Específicamente, se unen a la base purica guanina en el nitrógeno en posición 7 y los compuestos bifuncionales producen derivados de la 7-alquil diguanina. Así, se produce una unión cruzada entre las dos cadenas del ADN, interfiriendo en su duplicación y por ende en la mitosis.

El transportador (M) de la ciclofosfamida contiene un puente fósforo-nitrógeno, que hidrolizado libera el metabolito al medio. Aunque hay activación "in situ", normalmente la ciclofosfamida es metabolizada en el hígado, y la formación de 4-hidroxíciclofosfamida, metabolizada por el citocromo P-450, es un paso necesario para producir metabolitos activos.

La 4-hidroxíciclofosfamida y su forma tautomérica, la aldofosfamida son transportadas a las células blanco donde ellas son convertidas de forma no enzimática en metabolitos activos, la mostaza fosforamida y la acroleína. El 4-hidroxi metabolito es después oxidado enzimáticamente a 4-cetociclofosfamida, un metabolito inactivo. La aldofosfamida por otro lado, es inactivada por la aldehído deshidrogenasa carboxifosfamida.

La mostaza fosforamida se cree entonces que actúa como un agente alquilante de una manera similar a otras drogas de esta clase (Ludlum 1977). El cloroetil lateral de la cadena se cicla para formar un etilenimonium intermediario, altamente reactivo, puede reaccionar con el grupo nucleofílico a través de la formación de un ión carbonium. Respecto al mecanismo de acción; la alquilación del N en posición 7 de los residuos de guanina en el ADN, está relacionado con sus efectos citotóxicos. La siguiente figura esquematiza la activación de CPA.

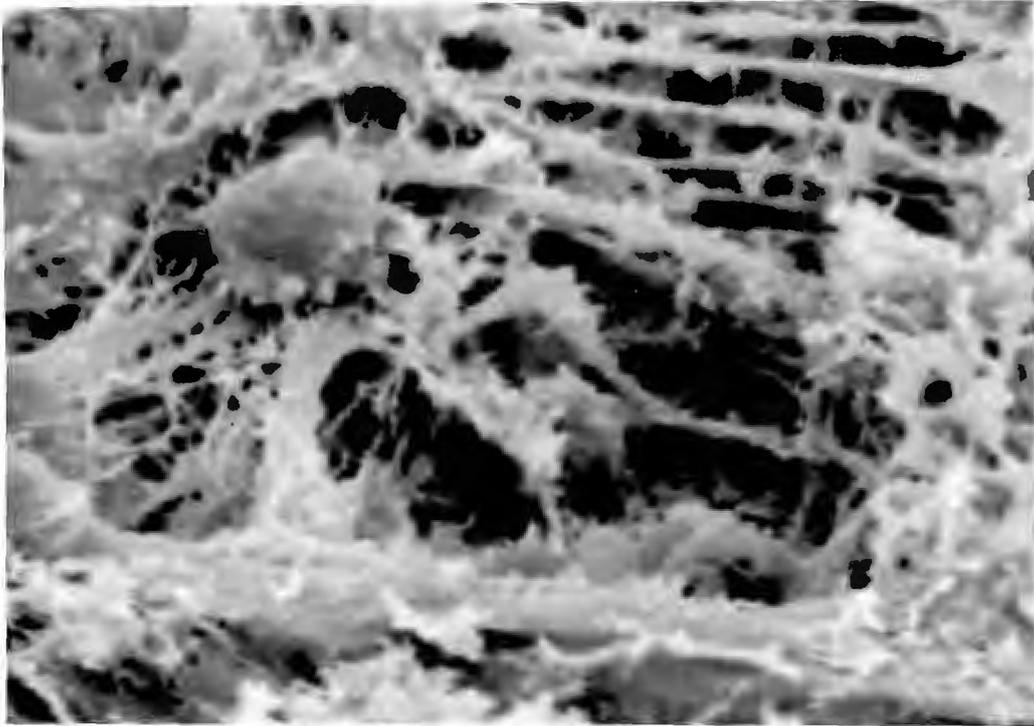
## ACTIVACION DE CICLOFOSFAMIDA



CPA es activada por el sistema de citocromos P450 hepático y sus metabolitos transportados por el sistema circulatorio a los tejidos. El efecto citotóxico está relacionado no solo a la cantidad de metabolitos sino también a su tasa de producción. Se desconoce la causa última de muerte celular en relación con el daño del ADN. Entre las respuestas celulares posibles están; la detención del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis. Goodman y Gilman, 1996

Siguiendo a la formación del primer puente covalente, el segundo grupo cloroetil actúa en forma similar a la anterior, a la ciclización sigue la alquilación. Esta lleva a una unión covalente intercadena en el ADN, así como entre ADN y proteínas. Por otro lado, respecto a la acroleína está mostrado que produce roturas en las cadenas simples de ADN.

Al parecer, el efecto citotóxico de la ciclofosfamida, está tan relacionada a la cantidad total de metabolitos producidos como a su tasa de producción. Las drogas que modifican la actividad de las enzimas microsomales hepáticas no afectan totalmente su eficacia terapéutica, mientras que aquellas alteran las tasas de inactivación de los metabolitos reactivos pueden alterar su eficacia biológica. Normalmente, la concentración intracelular de la aldehído deshidrogenasa es comparativamente menor en las células tumorales que en las normales, lo que provee de un efecto citotóxico selectivo de la fosforamida nitrogenada sobre las primeras. Vale recordar que algunas células tumorales resistentes han mostrado contener altos niveles de aldehído deshidrogenasa. (Capizzi y Agrawal, 1992)



## **ANTECEDENTES ESPECIFICOS**

## **ANTECEDENTES ESPECIFICOS**

El sistema hematopoyético es uno de los ejemplos mejor estudiados de homeostasia tisular en los vertebrados. A partir de una célula madre totipotencial (S.C), ubicada en la médula ósea (M.O.) y a través de un complejo proceso de proliferación y diferenciación, entran diariamente al torrente circulatorio  $3 \times 10^{11}$  células de 8 tipos diferentes y en proporciones constantes. (Koishi Akoshi y col.; 2001 )

Lo que define al SC es su capacidad de proliferar, sin ningún indicador de diferenciación ni pérdida de potencialidad. Una sofisticada regulación entre autorrenovación y diferenciación, mantiene su número relativamente constante. A partir de ellas se suceden un conjunto jerárquicamente ordenado de progenitores pluripotentes (GEMM), bipotentes (GM) o monolínea (BFU-E) hasta llegar a las células diferenciadas. (Morrison S.J. y col. 1995; Grandillon, O.2001)

El compromiso hacia un determinado linaje y la subsecuente diferenciación, son obviamente objeto de interés clínico, de manera que estos procesos han sido profundamente estudiados. La explicación más aceptada, aunque no unánimemente, es la propuesta por el llamado modelo estocástico, desarrollado 1964 por Till D.E, McCulloch E.A y Siminovich para explicar la autorrenovación y la diferenciación de las células madres (HSC), cuando eran transplantadas en animales irradiados con dosis letales (Metcalf D, 2001). Básicamente, las células proliferan y se comprometen aleatoriamente, luego, un sistema selectivo de factores tróficos permite la sobrevivencia y la posterior diferenciación. Este modelo fue posteriormente extendido a toda la hematopoyesis. Varios autores encontraron evidencias que lo apoyan, fundamentalmente observando cultivos celulares clonales cuyas colonias desarrollan una variable combinación de líneas y siendo, la elección de estos linajes, independiente de cualquier influencia externa (Ogawa M. 1993; Pohlmann S.J y col. 2001). El rápido incremento en el conocimiento de los mecanismos apoptóticos reforzaron estas ideas.

La apoptosis es un activo proceso fisiológico de muerte celular que puede ser inducida por una variedad de estímulos. Implica una serie de cambios morfológicos y metabólicos. Estos culminan con la activación de endonucleasas que van a fragmentar de manera típica el ADN a nivel internucleosomal. La apoptosis juega un rol distinto a medida que avanza la diferenciación. Mientras es un regulador importante en el compartimiento más maduro, no está tan claro el rol que juega en la homeostasia del SC "in vivo", donde la extensión del compartimiento, parece regulada por un ajustado balance entre la proliferación y la diferenciación (Domen J. y col. 2000a, b )

El proceso apoptótico está modulado por factores endógenos, tales como los protooncogenes c-myc, p53; o exógenos, citoquinas como IL3 o factores de crecimiento como GM-CSF o EPO; pero en su regulación, cumplen un papel central las Bcl 2, una familia de proteínas tanto pro como antiapoptóticas. Mientras algunos miembros de esta familia bloquean la apoptosis (Bcl 2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bclw, Bfl-1, Bcl-1, Mcl1 y A1 ), otros la activan (Bax, Bad, Bak, Bid, Bik, Hrk y Bcl-xs ). El balance y la forma de dimerización entre ellas determina la sensibilidad a la muerte apoptótica ( Peters, R y col.; 1998)

Bcl-x<sub>L</sub> está particularmente implicada en la maduración del compartimiento eritroideo. Su expresión es EPO dependiente y está ubicada corriente abajo, en el camino regulatorio por el cual EPO previene la apoptosis. Se sabe que forzando la expresión de Bcl-x<sub>L</sub>, en las células privadas de EPO, se inhibe la apoptosis. Además, la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> está regulada en alza durante la maduración eritroidea terminal. De manera que ambas, EPO y Bcl-x<sub>L</sub>, parecen esenciales para la normal diferenciación eritroidea, dentro de las células rojas maduras, Sin embargo, la respuesta a EPO decrece durante la maduración. (Kelley y col. 1993; Vaux, D.L,1996; Silva y col 1999a)

Ahora bien, aunque es mucho lo que se ha aprendido acerca de los mecanismos por los cuales una célula autorrenovable, se compromete y se diferencia, el modelo estocástico comienza a ser cuestionado. Una alternativa distinta surge de considerar M.O. como una totalidad interactiva y asimilar el camino de la diferenciación, a una trayectoria tamponada por la interacción celular.

Hoy se acepta que una intrincada red de pequeños péptidos comunica a las células en tránsito hacia la diferenciación. Por ELISA pudo mostrarse que las CD34<sup>+</sup>, aisladas “ex vivo”, secretan: a) moléculas vinculadas a su propia proliferación, b) moléculas vinculadas a su inhibición y quiescencia y c) moléculas con efecto antiapoptótico. Además, se sabe que megacarioblastos, eritroblastos y mieloblastos, así como progenitores en cultivo, CFU-GM o BFU-E, secretan en concentraciones fisiológicas, factores de crecimiento y citoquinas conformando un sistema de interacciones celulares conocido como “cross-talk” (Majka y col. 2001)

Estos factores, secretados por los mismos elementos que se diferencian, son además producidos por el microambiente y algunos externos al sistema, como el caso de la EPO renal, conformando así un sistema complejo, de límites imprecisos y parcialmente autorregulado (Sieweke, M.H y col. 1998; Janoska-Wieczorek y col. 2001). De allí que en determinadas condiciones fisiológicas puedan presentarse una MO hiperproliferativa con bajos títulos plasmáticos de EPO o la inversa, una MO hipoproliferativa con altos títulos hormonales. (Bozzini C.E y col. 1992)

Estos factores, secretados normalmente por las células en proceso de diferenciación, aún en concentraciones fisiológicas muy bajas, son biológicamente más activos que sus homólogos recombinantes administrados exógenamente (Majka y col. 2001). Ocurre, que el efecto observado resulta de la interacción total de los elementos en juego. Una respuesta celular, no solo depende de la presencia de un estímulo, sino además, de la sensibilidad tisular (regulación en baja o alta de receptores, variación de la afinidad, etc.), además de la presencia de otras citoquinas que pueden sinergizar o inhibir una respuesta. Por ejemplo, el TGFβ secretado por los progenitores linfopoyéticos regula en alta la expresión de Bcl-2, una proteína antiapoptótica, jugando un rol importante en la sobrevivencia y subsecuente diferenciación de los progenitores primitivos proliferantes (Mang Xiao y col., 2000). Mientras la administración exógena de TGFβ por otros mecanismos, afecta el ciclo celular e inhibe la proliferación de estas células ( Miller K.L y col., 1992)

Un modo de trabajar según este modelo, es apartarlo de su equilibrio, por ejemplo, empleando citotóxicos y analizar el comportamiento de elementos biológicamente significativos durante su reequilibración. Se sabe que la injuria, producida por estas drogas, induce la expresión de moléculas proinflamatorias (TGF  $\beta$ , TNF  $\alpha$  e Il-1) y secundariamente, citoquinas mediadoras de la inflamación (Mip  $\alpha$  y IFN  $\gamma$ ) que pueden afectar diferencialmente el crecimiento de los progenitores (Allen D.A. y col., 1999)

Ha sido mostrado que el Mip  $\alpha$ , el TGF  $\beta$  y el TNF  $\alpha$ , pueden cada una de ellas, inhibir o estimular el crecimiento de los progenitores mas maduros tales como CFU-GM, o inhibir los progenitores eritroides, dependiendo de la concentración y de la citoquina empleada (Robertson, J.D y col. 2000)

De manera que la acción del citostático implica un reordenamiento de las relaciones entre los elementos en juego, con la instalación de un nuevo “cross-talk”, destinado a reestablecer la homeostasia. Esto significa, entre otras cosas, reclutar los progenitores de la quiescencia, aumentar su proliferación para expandir los compartimentos, o restringir la apoptosis

La Ciclofosfamida (CPA, 2-[bis-/2 cloroetil-amino]-tetrahidro-2H-1, 2, 3-oxoza-fosforina-2-óxido), es una mostaza nitrogenada análoga, actualmente utilizada como uno de las mas efectivas prodrogas anticancerosas. Son bien conocidos el amplio espectro de efectos citotóxicos que exhibe esta droga . (Fraiser y col., 1991; Loadman y col., 1994). La selectiva hematotoxicidad que la CPA ejerce sobre los progenitores eritroides fue exhaustivamente confirmada “in vitro” (Malerba y col., 2004) y además, muchos estudios “in vivo” mostraron que una simple dosis de CPA afecta profundamente la eritropoyesis causando un transitorio desvío de este proceso al bazo (Aggio y col., 1974; Aguirre y col., 1999; Sefc y col., 2003). Al parecer la CPA es capaz de desencadenar, tempranamente después de su aplicación, tanto procesos apoptóticos como necróticos en la MO (Mazur y col., 2002).

Varios autores estudiando los mecanismos involucrados en este efecto, mostraron, que en concentraciones de uso clínico, CPA induce la producción de óxido nítrico (Pelaez y col., 2001), del interferón-gamma (INF- $\gamma$ ) (Schiavoni y col., 2000), y del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Othami y col., 2006).

Ahora bien, todas estas moléculas son moduladores negativos de la eritropoyesis y básicamente pueden actuar por dos mecanismos: disminuyendo la producción de EPO, o reduciendo la respuesta a la hormona en MO. (Dai y col., 1999; Johnson y col., 1990; Jelkmann y col., 1998; Schobersberger y col., 1996). Por otro lado, se acepta que EPO regula positivamente la eritropoyesis, al menos en parte, porque induce la expresión de EPO-R además de factores de transcripción específicos de la diferenciación eritroide (Gregory y col., 1999). y proteínas cruciales para la supervivencia como Bcl-xL (Gregoli y col., 1997; Silva y col., 1999).

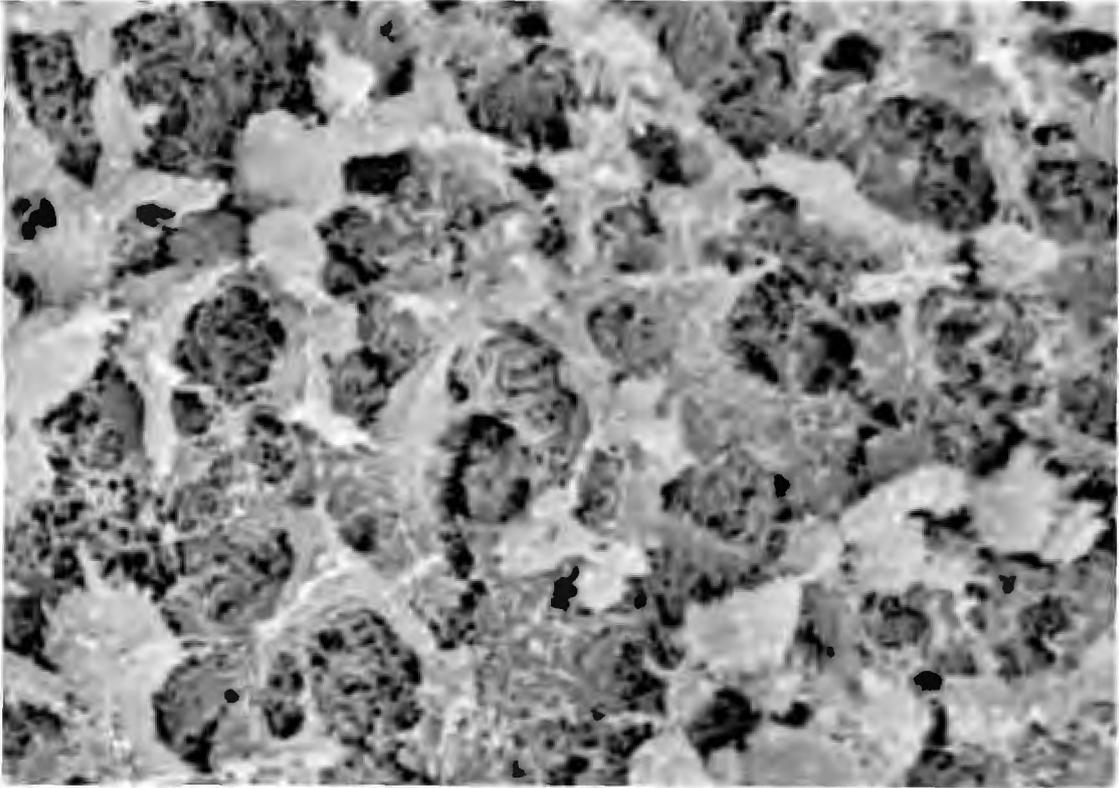
Esto es suficiente para mostrar el carácter multigénico y pleiotrópico de los mecanismos regulatorios de la eritropoyesis y explicar, al menos en parte, el carácter no lineal de la respuesta de EPO, cuando es administrada terapéuticamente. (Steinbrook, R; 2007)

## **OBJETIVOS**

Los mecanismos por los cuales en M.O., una célula autorrenovable, prolifera, se compromete en un linaje y se diferencia son todavía, pobremente comprendidos. Se acepta que una intrincada red de citoquinas, factores de crecimiento, etc, actuando en forma sinérgica, redundante, pleiotrópica y hasta antagónica, regulan estos procesos, conformando un sistema de interacciones azarosamente interferidas que han dado en llamarse “cross-talk” (De Haan y col. 1996; Bauer; 2000.) Cuando el sistema es perturbado, por ejemplo por acción de citotóxicos, los progenitores celulares son reclutados de su estado de quiescencia, se induce la liberación de nuevas citoquinas, y se incrementa la proliferación y/o la apoptosis. Es decir se instala un nuevo cross-talk destinado a reestablecer la homeostasia tisular (de Vries y Singer;2000). Nos propusimos analizar este proceso de re-equilibración de la M.O. murina, después de la administración de única dosis de CPA(150 mg/kg de peso), correlacionando la celularidad medular, la apoptosis, la expresión de proteínas relacionadas (EPO-R, Bax y Bcl-x<sub>L</sub>) y el compartimento de progenitores hematopoyéticos, con la proliferación celular hasta 10 días pos-tratamiento. Para ello se diseñaron las siguientes experiencias.

- 1) Se evaluó cuali y cuantitativamente la celularidad medular por métodos hematológicos convencionales.
- 2) Se registró el efecto sobre la arquitectura y el microambiente medular mediante Microscopía Electrónica de Barrido
- 3) Se determinó la variación de los procesos apoptóticos durante la recuperación medular por la técnica del TUNEL
- 4) Se estableció el patrón de recuperación de los progenitores hematopoyéticos con ensayos de clonación. Cuantificando colonias Eritroideas tempranas (BFU-E) y tardías (CFU-E)

- 5) Se evaluó la variación de la respuesta proliferativa medular a EPO por incorporación al DNA de Timidina tritiada.
- 6) Se cuantificó la variación de la expresión de proteínas, EPO-R, Bax y Bcl-xl por Western blott, en lisados celulares de médula ósea obtenidas durante la recuperación medular.
- 7) Los resultados se procesaron estadísticamente.
- 8) Los resultados se publicaron como "*EPO receptor, Bax and Bcl-xL expressions in murine erythropoiesis after cyclophosphamide treatment*" (2007) *Toxicology* 231: 188-199



## **MATERIALES Y METODOS**

## **MATERIALES Y METODOS**

### **ANIMALES :**

Ratones machos adultos de la cepa CF-1 Swiss, con un peso promedio de 26–28 g, fueron usados para todo el protocolo experimental. Durante el periodo experimental, a los animales se les permitió el libre acceso al alimento y al agua. Las experiencias fueron conducidos de acuerdo a los principios sostenidos por la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1996).

### **GRUPOS EXPERIMENTALES**

Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Un grupo control (n = 48) de animales para las determinaciones hematológicas, recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina. Un segundo grupo (n = 100) fue tratado con CPA.

A su vez, los animales del grupo tratado fueron subdivididos en dos subgrupos, de uno de ellos (n =62) se obtuvieron los lisados de M.O. para western blottings, (n=8 ratones entre los días 1 y 4 ; y n=6 ratones para los días 0, 5, 6, 7 y 10 , pos CPA). El otro subgrupo de ratones tratados con CPA (n= 38) fue usado como fuente de MO murina para los otros ensayos. Las muestras fueron tomadas: los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 pos CPA; (n = 5) entre los días 1 y 2 , y (n = 4) para los otros días del protocolo experimental.

Eritropoyetina humana recombinante (EPO) – Hemax 2000, Biosidus, Argentina – fue usada para los ensayos “ex-vivo”. Como se sabe, EPO es específica de clase; la reactividad biológica cruzada entre mamíferos ha sido extensamente documentada (Wen y col., 1993).

**AGENTE CITOTOXICO:** Ciclofosfamida (CPA) (CAS no. 6055-19-2; Sigma, St. Louis, MO, USA). La CPA (150 mg/kg) fue disuelta en solución salina e inyectada intraperitonealmente. La dosis utilizada fue seleccionada de acuerdo con la literatura (Blankenberg y col., 2001), considerada equivalente a una dosis humana de 525 mg/m<sup>2</sup> (Freireich y col., 1966)

## **CELULARIDAD TOTAL Y DIFERENCIAL**

Los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical como previamente fue descrito (Aguirre y col., 2005). Las células de MO fueron extraídas del fémur derecho por lavado del canal medular con 500  $\mu$ l de Minimum Essential Medium (MEM, Alpha Modification. Sigma Chemical Co. SA).

El total de células de la MO se obtuvo contando en cámara de Neubauer diluciones en solución de Türk (1/20) de cada uno de los días establecidos en el protocolo. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como promedio de células nucleadas por fémur  $\times 10^6 \pm$  SEM.

La determinación diferencial de células fue realizada contando entre 500–1000 células en extendidos teñidos con May Gründwald Giemsa (MGG). Las células fueron clasificadas en eritroideas, mieloideas y linfoideas. Se determinó el porcentaje correspondiente a cada linaje y el conteo diferencial entre subpoblaciones. La celularidad absoluta de cada linaje en las muestras de MO fue calculada por la relación entre estos porcentajes y la totalidad de las células determinadas en las muestras de MO. Los resultados son expresados como número de células eritroideas, mielodeas o linfoideas  $\times 10^6$ /femur (media  $\pm$  SEM) de tres diferentes ensayos.

## **MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.**

Los fémures fueron removidos y cortados axialmente. Las piezas frescas fueron conservadas en una solución fría de fijación (5% formaldehído, 6% ácido acético, 65% etanol y 24% de agua). Posteriormente las muestras fueron deshidratadas y secadas hasta punto crítico (Dento Drier). Luego expuestas a una cobertura oro-paladium durante 3 minutos y observadas por Microscopía Electrónica de Barrido.(Jepl JSM-5800 L.V.) Esta técnica permite conservar la arquitectura tisular y así se obtuvieron imágenes de M.O. ( $\times 3000$ ), cada día del esquema experimental.

## **APOPTOSIS**

La apoptosis inducida por CPA fue evaluada por la técnica del TUNEL (TdTmediated dUTP Nick-End Labelling), usando ApoptoTag (Intergen Co. New York), un kit que marca directamente “in situ” con fluoresceína a la célula apoptótica. Las muestras fueron procesadas, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, entre los días 0 y 5 después de la injuria. Extendidos de MO fueron fijados durante 20 minutos en paraformaldehído al 4%. Luego de exponerlas a la acción proteolítica de Proteinasa K y con lavados intermedios con PBS, las improntas fueron sometidas a la acción de la enzima TdT(deoxinucleotidiltransferasa terminal) que cataliza la adición independiente de moldes de desoxinucleotidos trifosfato, marcando con fluoresceína los extremos 3'(OH) terminales de los fragmentos de DNA (50-300 pb de longitud). Luego del lavado intermedio, se realizó la contracoloración de las improntas por 10 min. con Ioduro de Propidium, en glicerol 50% pH 8, para su montaje y conservación.

Los preparados fueron evaluados por microscopía de fluorescencia (Nikon). El porcentaje de células apoptóticas fue calculado a partir de campos aleatoriamente seleccionados en cada extendido. En cada campo se contó un centenar de células, un total de quinientas para cada muestra tomada; a su vez, cada muestra fue obtenida por triplicado. Los resultados son expresados como porcentaje promedio  $\pm$  SEM de células apoptóticas.

## **ENSAYOS CLONOGÉNICOS**

Células de M.O. de animales tratados con CPA y de cada día del período en estudio, fueron evaluadas por su capacidad de formar colonias hematopoyéticas en medio semisólido, usando como soporte la metilcelulosa. Estos cultivos “in vitro” de células progenitoras, se realizaron de acuerdo a técnicas descriptas previamente (Romero Benítez y col., 2004). Brevemente,  $2 \times 10^6$  células/ml de MO, fueron cultivadas en placas de 24 pozos conteniendo 0.5 ml de medio de Iscove modificado por Dulbecco (IMDM, Sigma, St.

Louis, Mo, USA), 1% metilcelulosa, 20% de suero fetal bovino (FBS), 1% de albúmina sérica deionizada (BSA, Sigma Co, USA), 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 300 µg/ml de glutamina, 150 µg/ml de transferrina, penicilina y estreptomycin mas EPO, 1U/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Las células fueron cultivadas hasta 7 días a 37 °C en atmósfera humidificada y con 5% CO<sub>2</sub>. Las colonias fueron contadas con un microscopio invertido Olimpos IMT-2 (Olimpos, Japón) después de 2 días de incubación; aquellas que presentaban mas de 8 células fueron identificadas como unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E). Después de 7 días de incubación, las colonias que contenían mas de 40 células, se asumieron como unidades formadoras de burst eritroideos (BFU-E). Los resultados se expresan como colonias x 10<sup>3</sup> / fémur (media ± SEM).

#### **ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.**

La respuesta proliferativa se midió por incorporación de metil timida tritiada al ADN precipitable, según método descrito anteriormente.(Brandan, N.C. y col., 1981). Brevemente, se cultivaron en microplacas 4,5x10<sup>5</sup> células de M.O. obtenidas a diferentes días del esquema experimental (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 días) y con concentraciones variables de EPO (0 a 250 mU/ml) (HEMAX 2000, Biosidus, Argentina) en alfa medio sin desoxiribósidos (Sigma), suplementado con penicilina, estreptomycin, 2-mercaptoetanol, 20% de SFB inactivado (Gibco Co, USA), glutamina y transferina-Fe.

A las 22 hs de incubación en estufa humidificada y gaseada (5% CO<sub>2</sub> a 37°C), se agregaron 10 µl de alfa-medio con 0,5 µCi de metil (3H TdR) timidina (1 mCi/ml, 20 Ci/mM, Dupont Nen, USA). Después de 2 horas de incubación, las células fueron lavadas con PBS y tratadas con ácido tricloroacético al 5%. Centrifugadas y el precipitado resuspendido en metanol, seguido por una nueva centrifugación y resuspensión en NaOH 0.1N. La incorporación de la [3H] timidina fue medida en un contador de centelleo (Rack Beta-Pharmacia). Los cultivos se realizaron por cuadruplicado y los resultados son expresados como cuentas por minuto (cpm media ± SEM.)

## **WESTERN BLOTTING**

### **OBTENCION DE LISADOS DE TEJIDO HEMATOPOYÉTICO:**

A fin de evaluar la influencia de EPO sobre el patrón de expresión de EPO-R y proteínas relacionadas a la sobrevivencia celular (Bcl-xL y Bax), suspensiones de células de M.O. fueron incubadas con y sin EPO.

Brevemente, suspensiones de  $20 \times 10^6$  células de MO, obtenidas en cada uno de los días programados y sostenidas en Minimum Essential Medium (MEM, Alpha Modification. Sigma Chemical Co. St Louis, MO), suplementado con 20% de suero fetal bovino, 1% de albúmina sérica bovina, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 300  $\mu\text{g/ml}$  de glutamina, 150  $\mu\text{g/ml}$  transferrina, penicilina y estreptomina, fueron divididas en dos alícuotas e incubadas durante 2 h a 37°C, en atmósfera humidificada y con 5% CO<sub>2</sub>, con y sin EPO (2 UI/ml).

Luego las células fueron centrifugadas a 700 rpm durante 5 minutos y lavadas con PBS. Después de 3 lavados se las trató con buffer RIPA (50mM Tris, 150 mM NaCl, 2.5 mg/ml ácido deoxycólico, 1 mM EGTA, 10  $\mu\text{g/ml}$  Nonidet-40, pH 7.4, suplementado con inhibidores de proteasas: 2.5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina, 0.95  $\mu\text{g/ml}$  aprotinina y 2.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride) durante 20 minutos en baño de hielo. Las células, disruptas por pasaje a través de agujas de diámetro decreciente, fueron centrifugadas en frío a 10.000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes fueron recuperados y conservados a -20°C, separando previamente alícuotas para el dosaje de proteínas por el método de Bradford. Los lisados fueron corridos en SDS-PAGE y transferidos para la inmunodetección posterior de las proteínas; EPO-R, Bax, Bcl-XL.

### **ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS PAGE**

Los geles de resolución se prepararon: SDS-buffer con Acrilamida-Bis acrilamida (30:0.8) , Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 12 % , buffer separador 3.0 M Tris-HCL(pH:8.8), N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamina (TEMED) y Persulfato de Sodio (APS) 1,5%. Para realizar la corrida se utilizó un sistema de electroforesis horizontal tipo Miniprotean II Electrophoresis Cell(Bio Rad,Usa), con buffer de corrida 0,25 M Tris, 1,22 M Glicina , 1% SDS (pH 8.8).

Las muestras fueron procesadas para determinar fracciones proteicas intracelulares (Bradford, Sigma, Co, USA), De todos lisados celulares se sembraron 40 µg/línea de proteínas y en todas las corridas, se sembraron junto a la muestra, marcadores preteñidos de peso molecular conocido ( Bio Rad USA).

Los geles fueron coloreados con Coomassie Blue R 250 (Bio Rad) y posteriormente secados o bien transferidos a membranas de nitrocelulosa.

### **ELECTROTRANSFERENCIA (ELECTROBLOTTING)**

La electrotransferencia se realizó utilizando soporte de membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (20 mM Tris-150mM Glicina, 20% Metanol, pH 8.3 ). La calidad de la electrotransferencia fue evaluada con la tinción reversible de rojo Ponceau S.

### **INMUNODETECCION**

Tanto para los lavados como para la preparación de anticuerpos y solución bloqueante se utilizó buffer TBS-Tween ( 50mM Tris-ClH, 150mM NaCL, 0,05% Tween pH7,5). La membrana fue preincubada toda la noche con agitación a 4°C (o 1hora a temperatura ambiente) en solución bloqueante (5% leche descremada en TBS-Tween), fue incubado con el anticuerpo primario, disuelto en solución bloqueante, en tiempo, dilución y temperatura variable, dependiendo del anticuerpo; posteriormente fue lavado con TBS-T e incubado con el anticuerpo secundario, también diluido en solución bloqueante, durante 1h, a temperatura ambiente y nuevamente lavado con el buffer correspondiente.

Los anticuerpos primarios fueron: policlonales de conejo anti Bax (SC-6236) y anti EPO-R (SC-697); además un policlonal de cabra anti Bcl-xL (SC-7122) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Todos los anticuerpos fueron diluidos 1/500, en la solución de bloqueo, mientras las condiciones de incubación fueron optimizadas para cada anticuerpo.

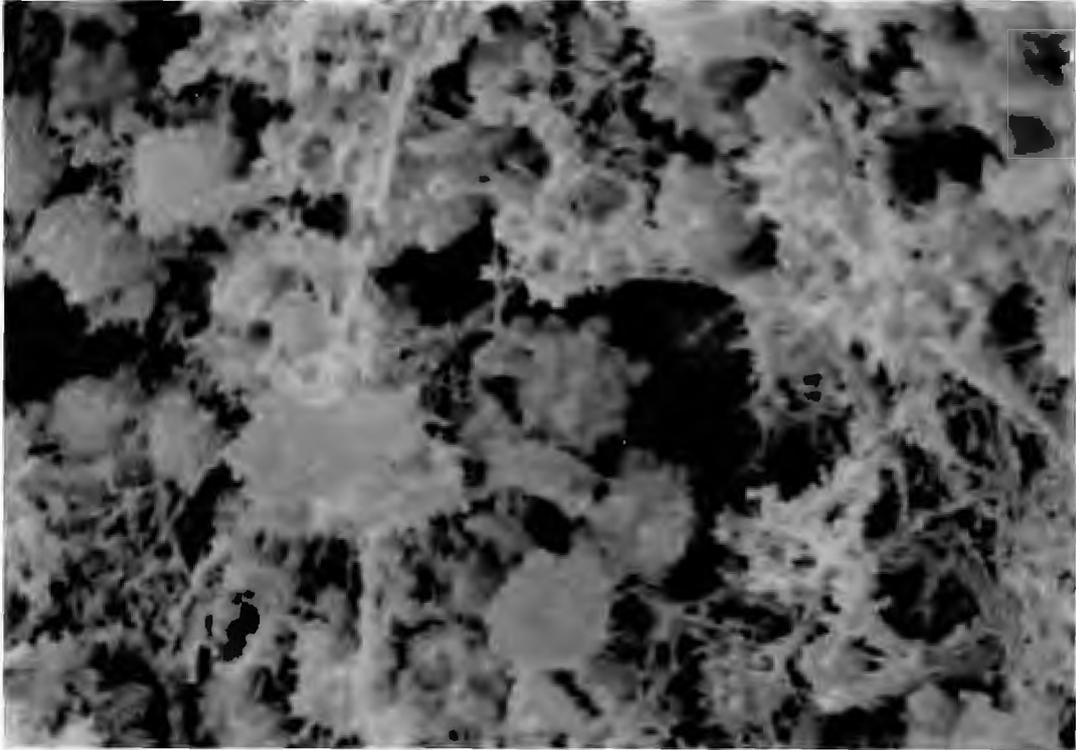
Como anticuerpos secundarios se usaron: IgG de cabra anti- conejo (CN 111-035-045) y IgG de asno anti-cabra (CN1705-035-147), marcados con

peroxidasa (HRP) (Jackson Immunoresearch Inc.), fueron diluidos al 1/2000 en solución bloqueante, e incubados durante 1 hora a temperatura ambiente.

La unión de la peroxidasa fue detectada con Opti4CN kit (BioRad). Los resultados se expresan como Unidades Arbitrarias (UA) obtenidas de la razón entre las unidades densitométricas de las proteínas en estudio y la carga de proteínas (Podesta y col., 2000).

### **IMÁGENES Y ANALISIS ESTADISTICO**

Los resultados hematológicos de los animales tratados con CPA y los del grupo control, fueron analizados estadísticamente usando el test de Bonferroni. Los datos de todas las otras experiencias fueron comparadas por ANOVA seguido por Dunnett's *t*- test. Los análisis fueron realizados usando InStat and Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Un valor de  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Los gráficos fueron obtenidos usando Graph Pad Prism software y Adobe Photoshop 8.0. La densidad óptica de los inmunoblots fueron analizadas usando Scion Image 3.0 software.



## **RESULTADOS**

EXPERIENCIA N 1

EFFECTO DE CPA SOBRE LA CELULARIDAD DE M.O.

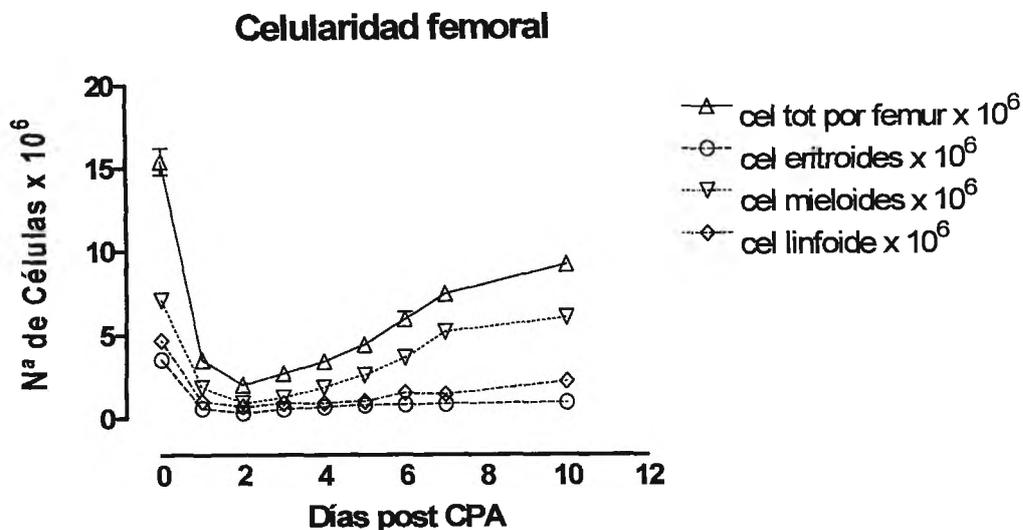


FIGURA 1 – Nº ABSOLUTO DE CELULAS ERITROIDES, MIELOIDES Y LINFOIDES DESPUES DE LA INYECCION DE CPA

Tabla 1

Tipo de célula	Células Totales (x 10 <sup>6</sup> /femur)		Cel. Eritroides (x 10 <sup>6</sup> /femur)		Cel. Mieloides (x 10 <sup>6</sup> /femur)		Cel. Linfoides (x 10 <sup>6</sup> /fémur)	
	Control	CY	Control	CY	Control	CY	Control	CY
1	14.8 (0.8)	3.5*** (0.2)	2.7 (0.15)	0.6*** (0.05)	7.1 (0.60)	1.9*** (0.10)	4.9 (0.30)	1.0*** (0.05)
2	13.4 (0.5)	2.0*** (0.3)	3.2 (0.25)	0.3*** (0.05)	6.2 (0.45)	0.9*** (0.15)	3.9 (0.20)	0.7*** (0.10)
3	14.0 (0.4)	2.7*** (0.3)	2.7 (0.25)	0.5*** (0.05)	6.3 (0.50)	1.2*** (0.15)	4.8 (0.15)	0.9*** (0.10)
4	12.6 (0.9)	3.4*** (0.4)	3.2 (0.30)	0.7*** (0.10)	6.0 (0.55)	1.8*** (0.20)	3.4 (0.25)	0.9*** (0.10)
5	17.6 (0.6)	4.4*** (0.4)	3.5 (0.35)	0.8*** (0.05)	8.2 (0.55)	2.6*** (0.25)	5.7 (0.45)	1.0*** (0.10)
6	16.4 (0.9)	5.9*** (0.4)	3.8 (0.65)	0.8*** (0.50)	7.0 (0.45)	3.6*** (0.20)	4.8 (0.15)	1.5*** (0.10)
7	17.4 (0.7)	7.4*** (0.2)	3.8 (0.40)	0.8*** (0.50)	8.0 (0.15)	5.1*** (0.10)	5.6 (0.40)	1.4*** (0.30)
10	17.2 (0.9)	9.1*** (1.2)	3.7 (0.60)	0.9*** (0.10)	7.9 (0.20)	6.0** (0.20)	4.9 (0.35)	2.2*** (0.05)

El número total de células femorales fue determinado según técnica descrita en Materiales y Métodos, cada uno de los días del esquema experimental. Los porcentajes de los distintos linajes fueron determinados contando de 500-1000 células en extendidos teñidos con May Grönwald Giemsa (MGG). Los conteos se realizaron por triplicado y los resultados comparados con los valores control, están expresados como media  $\pm$  SEM  $\times 10^6$  células /fémur. Respecto a la muestra;  $n=6$  para los valores control y para todos los animales tratados con CPA, a excepción de los grupos comprendidos entre los días 1 y 4, donde  $n=8$ .  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  indica diferencia significativa entre los animales tratados y los animales control.

Como se observa en la Tabla 1, la celularidad de la MO decrece drásticamente alcanzando valores mínimos alrededor del segundo día después de la inyección de CPA; casi 8 veces debajo del control ( $P < 0.05$ ). Aunque la CPA afecta todos los linajes hematopoyéticos (eritroides, mieloides y linfoides), tal como se esperaba, el compartimiento rojo fue el más afectado. El número absoluto de células eritroides en MO descendió casi 11 veces comparado con el control, mientras el número de las células mieloides y linfoides disminuyeron 7,7 y 7 veces respectivamente, también comparado con parámetros normales ( $P < 0.05$ ). A partir de entonces, comienza la recuperación en todos los compartimientos. Vale señalar que el más activo es el mieloide. Típica de esta recuperación es la rápida expansión de la razón granulocito/eritroide. Aunque el número total de las células de MO se incrementan gradualmente, no alcanza sin embargo a restablecerse la normalidad cuando termina la experiencia.

## EFFECTO DE CPA SOBRE LOS PRECURSORES ERITROIDEOS

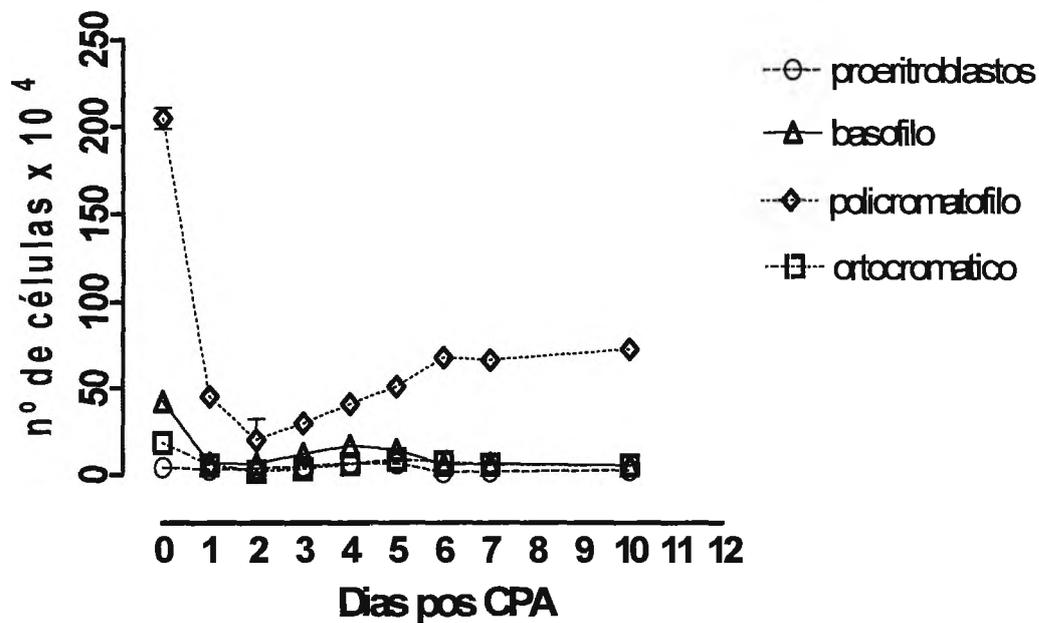


FIGURA N°2 VARIACION EN EL N° ABSOLUTO DE PROGENITORES ERITROIDES DESPUES DE LA INYECCION DE CPA.

Tabla 2

Tipo de célula eritroide	Proeritroblastos (x 10 <sup>4</sup> /fémur)		Eritroblastos Basófilos (x 10 <sup>4</sup> /femur)		Eritroblastos Policromatofilos (x 10 <sup>4</sup> /femur)		Normoblastos Ortocromaticos. (x 10 <sup>4</sup> /femur)	
	Control	CY	Control	CY	Control	CY	Control	CY
Día de muestra								
1	4.2 (0.55)	2.80 (0.35)	42.5 (2.15)	6.6*** (1.20)	204.6 (11.9)	45.2*** (3.4)	18.4 (0.45)	5.7*** (0.5)
2	4.3 (0.65)	3.70 (0.40)	43.0 (2.40)	6.4*** (0.45)	261.8 (20.1)	20.0*** (30.1)	23.9 (1.9)	1.9*** (0.3)
3	4.3 (0.40)	4.70 (0.60)	43.0 (4.15)	12.2*** (2.20)	204.6 (17.1)	29.7*** (1.9)	20.9 (3.35)	3.4*** (0.25)
4	4.6 (0.60)	6.50* (0.45)	45.4 (4.05)	16.7*** (2.95)	262.0 (22.4)	40.8*** (5.45)	24.4 (2.9)	6.1*** (1.1)
5	4.6 (0.40)	6.60* (0.30)	46.3 (0.35)	14.5*** (0.65)	275.8 (29.2)	51.0*** (3.0)	25.4 (1.5)	8.8*** (0.95)
6	5.0 (0.65)	1.47*** (0.20)	47.8 (4.75)	5.9*** (0.65)	294.0 (5.55)	67.9*** (3.5)	32.9 (4.0)	7.4*** (0.55)
7	5.0 (0.65)	1.90** (0.25)	48.3 (0.65)	6.7*** (0.55)	297.8 (15.0)	66.6*** (3.6)	33.3 (1.25)	5.9*** (0.45)
10	4.9 (0.70)	2.70* (0.85)	47.3 (2.30)	5.5*** (0.75)	299.0 (18.5)	72.8*** (1.95)	26.4 (0.95)	5.5*** (1.05)

Los precursores eritroides fueron identificados siguiendo los criterios estándar. A cada día del esquema experimental se contaron entre 500-1000 células en extendidos de MO teñidos con May Grönwald Giemsa (MGG). Los extendidos se realizaron por triplicado. Las células fueron discriminadas como proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos y normoblastos ortocromáticos.

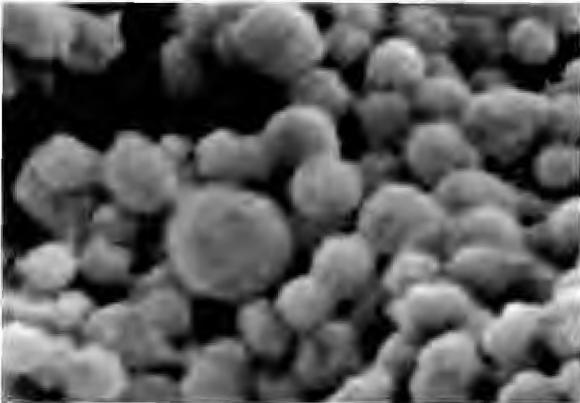
Respecto al tamaño de la muestra;  $n=6$  para los grupos control y para todos los animales tratados con CPA, a excepción de los grupos comprendidos entre los días 1 y 4, donde  $n=8$ . \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , indica diferencia significativa entre los animales tratados y los animales control.

Estos datos, confirman que CPA, altera profunda y específicamente el compartimiento eritroideo. Aún dentro de este compartimiento, es posible establecer diferencias acerca de la sensibilidad a la droga de los distintos precursores, vemos que CPA afecta principalmente a las poblaciones maduras. Es interesante señalar que los proeritroblastos son las únicas células eritroides que exhiben un transitorio pero significativo incremento entre el cuarto y el quinto día ( $P < 0.05$ ).

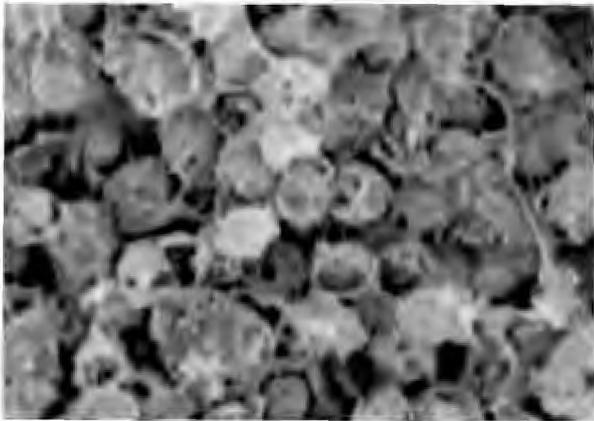
La respuesta de MO, evidencia la complejidad de las regulaciones, tanto locales como sistémicas, que caracterizan al sistema hematopoyético. Se hace necesario analizar el perfil de expresión de los genes que participan en este proceso de recuperación.

**EXPERIENCIA 2**

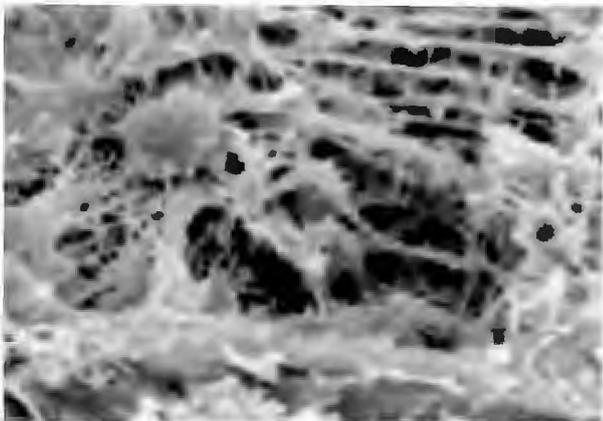
**MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO**



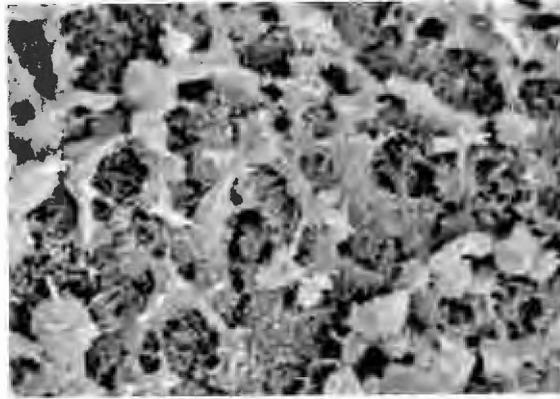
**0 Día**



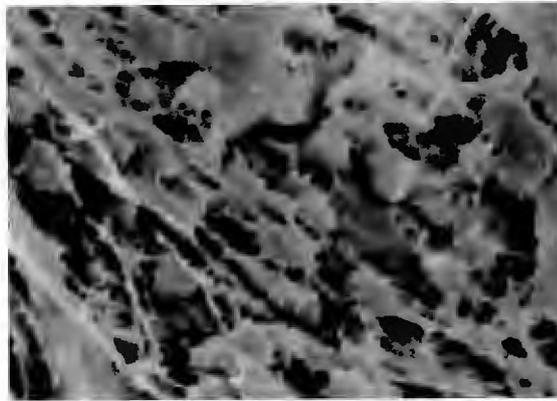
**1 Día**



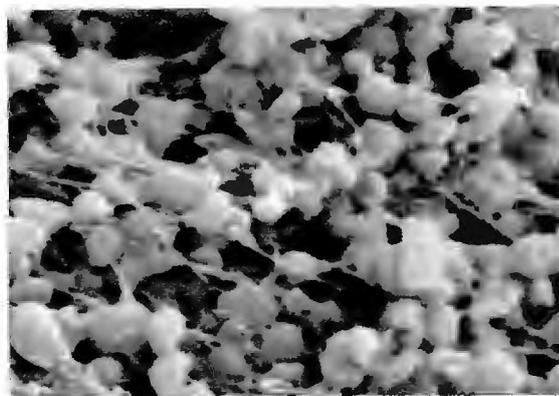
**2 Días**



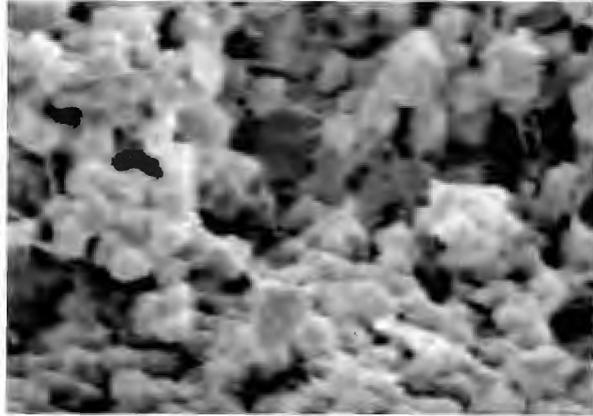
**3 Días**



**4 Días**



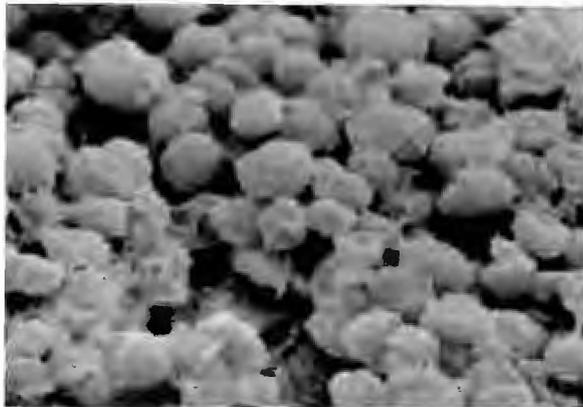
**5 Días**



**6 Días**



**7 Días**



**10 Días**

## **EFEECTO DE CPA SOBRE LA ARQUITECTURA DE MO**

En orden de evaluar el efecto de la CPA sobre la organización de la MO, fémures obtenidos en cada uno de los días experimentalmente establecidos, fueron observados por microscopía electrónica de barrido (M.E.B)..Las figuras muestran la imagen de la MO normal e injuriada por CPA: normal, día 0 y a los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 10, pos CPA.

Una característica evidente de la lesión inducida por la CPA es la alteración de la arquitectura interna de la MO. La primer fotografía, día 0, muestra la densidad celular normal en el fémur murino. La segunda fotografía, corresponde a un día después de la administración de CPA y muestra el efecto directo de la droga sobre la membrana celular. Dos días después del tratamiento con CPA la celularidad a descendido a su valor mínimo. Las trabéculas óseas aparecen desnudas sosteniendo células aisladas, y puede suponerse la suspensión de las interacciones célula-célula. A partir del quinto día, hay una aparente recuperación del número de células. De acuerdo al medulograma, esta expansión es con notoria participación del compartimento mieloide. El contacto intercelular, al menos en parte, parece haberse restablecido y presumiblemente con ello, las regulaciones concomitantes. A partir del séptimo día la médula parece haber recobrado su morfología normal.

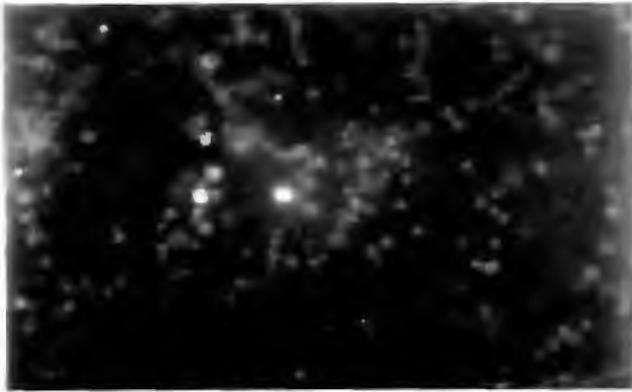
Las alteraciones presentes en la membrana, son similares a las observadas en muchas otras células y tejidos después de la aplicación de radiaciones ionizantes, del ataque por el sistema de complemento o los virus líticos. Se reconoce que CPA produce un daño inmediato sobre la membrana plasmática. A nivel molecular este tipo de alteración parece deberse a una acción directa de la droga sobre los compuestos lipídicos o protéicos de la membrana. Estas aparecen vesiculosas, como descascaradas y algunas directamente rotas. Cualquier pérdida de integridad de la membrana se asume como necrosis. La necrosis es una forma de muerte celular que se presenta cuando la célula es expuesta a una extrema variación de las condiciones fisiológicas ( hipotermia, hipoxia, tóxicos, etc.) que resultan en la incapacidad celular de mantener la homeostasia, llevando a una alteración del flujo de iones extracelulares y agua.

Las organelas intracelulares, más notablemente la mitocondria, y en general la célula entera, se hinchan y se rompen (lisis celular). Debido a la ruptura de la membrana plasmática, el contenido citoplasmático, incluidas las enzimas lisosomales, son liberadas dentro del fluido extracelular. De esto resulta que “in vivo”, la muerte celular necrótica este frecuentemente asociada con un extenso daño tisular y una intensa respuesta inflamatoria. Otros rasgos bioquímicos significativos es que no hay requerimiento energético. Es un proceso pasivo que también ocurre a bajas temperaturas (menos de 4° C)

Respecto a la recuperación total de la MO después de la aplicación de CPA., ha sido reportado la existencia de daño residual. Por otro lado, experiencias en las que se evaluaba la capacidad del estroma para sostener la proliferación de CFU-S, mostraron un deficit funcional que persistía al menos durante 6 semanas. El daño que provoca CPA es acumulativo y en dosis repetidas semanalmente puede llegar a ser permanente. Otros autores midiendo distintos parámetros, establecieron distintos tiempos de recuperación. Kalechman y col., estiman que alrededor del día 7, el estroma ha recuperado el 50 % de sus funciones normales.

**EXPERIENCIA 3**

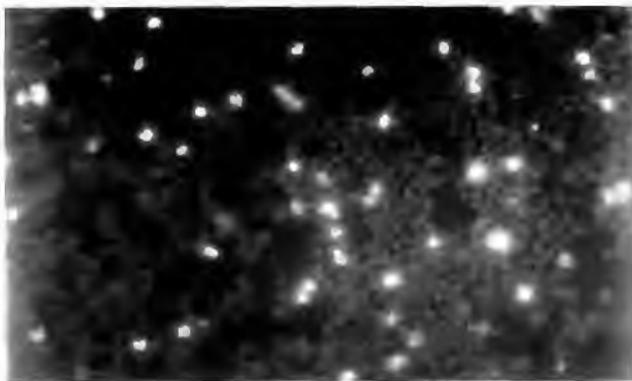
**APOPTOSIS**



**0 Día**



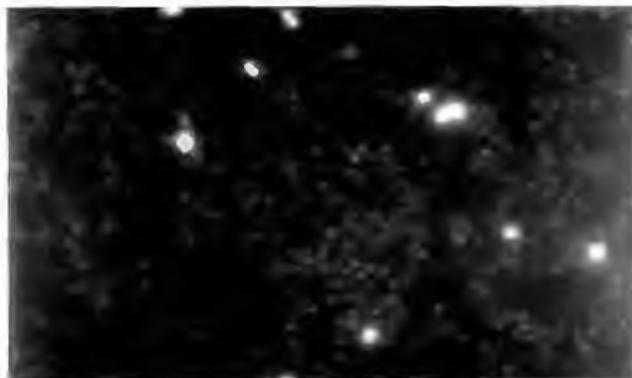
**1 Día**



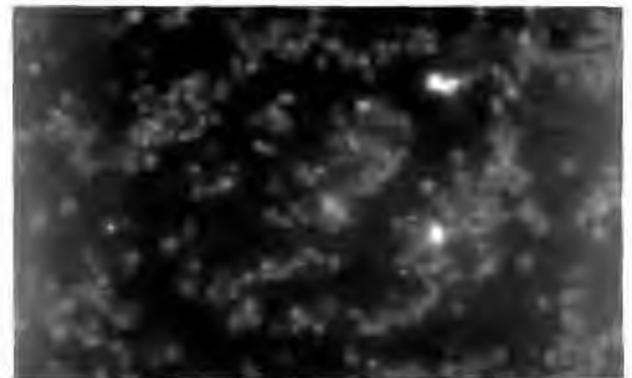
**2 Días**



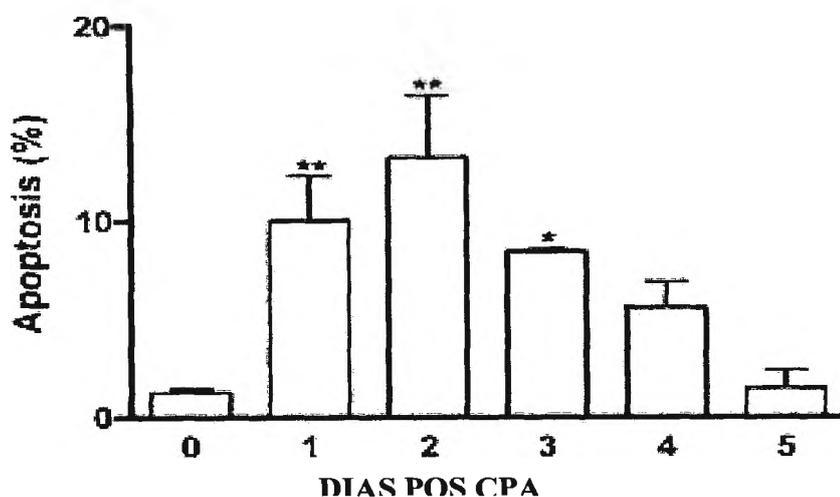
**3 Días**



**4 Días**



**5 Días**



**FIGURA N° 3. CUANTIFICACION DE LA APOPTOSIS**

La técnica TUNEL fue usada para cuantificar el daño del ADN en las células de la MO, después de la injuria con CPA. Las células fueron obtenidas a 0, 1, 2, 3, 4 y 5 días después y fijadas como se describe en Materiales y Métodos. Se contaron 500 células para cada muestra realizadas por triplicado. Los resultados se expresan como porcentajes (media  $\pm$  SEM); \*  $P < 0.05$  y \*\*  $P < 0.01$ , indican las diferencias significativas entre el grupo control y los animales tratados

El número de las células apoptóticas se incrementa dramáticamente al segundo día pos tratamiento ( $13 \pm 0.9 \%$ ,  $P < 0.01$ ) alcanzando su valor máximo, seis veces sobre el control ( $2.08 \pm 0.6 \%$ ). El índice apoptótico decrece progresivamente hasta retornar cerca de los valores normales al cuarto día pos CPA ( $4.60 \pm 0.98\%$ ).

La Figura 3 ilustra estos resultados experimentales. Los datos muestran una máxima apoptosis entre 24 y 48 horas después de la administración de la droga.

Las diferencias entre necrosis y apoptosis son múltiples. La apoptosis es un modo de muerte que ocurre bajo condiciones fisiológicas normales y afecta a células

individuales. Estas son un participante activo de dicho proceso por lo que se habla de suicidio celular. Es un mecanismo continuo, ubicuo y necesario para sostener la homeostasia tisular. Es observable en la inducción y el mantenimiento de la inmunotolerancia, en la organogénesis del sistema nervioso, etc. Puede ser es inducido por estímulos fisiológicos, como deprivación de factores de crecimiento, cambios en las condiciones microambientales, etc.

Las células bajo apoptosis muestran características morfológicas y bioquímicas particulares. Esto incluye, agregación de la cromatina, condensaciones nucleares y citoplasmáticas con formación de cuerpos apoptóticos. “In vivo”, estos cuerpos son rápidamente reconocidos por los macrófagos y fagocitados. “In vitro”, los cuerpos apoptóticos permanecen como fragmentos celulares y terminan lisándose. Esta fase terminal de la muerte de las células “in vitro” se la conoce como necrosis secundaria. Un rasgo morfológico típico es que la membrana citoplasmática aparece ampollada pero sin pérdida de su integridad.

Bioquímicamente es un proceso finamente regulado de activación enzimática. Energéticamente es dependiente de ATP; por eso se dice que es un mecanismo activo, no ocurre a bajas temperaturas (4°C). Hay liberación de varios factores, desde las mitocondrias al citoplasma, con activación de la cascada de caspasas. Aparecen alteraciones en la asimetría de la membrana celular, como por ejemplo, translocación de fosfatidilserina desde el lado citoplasmático al extracelular. Además, a diferencia de la necrosis, la apoptosis no implica la respuesta inflamatoria.

Uno de los últimos pasos del proceso apoptótico es la fragmentación del ADN, un proceso prelítico y no azaroso, que resulta de la activación de las endonucleasas durante el desarrollo del programa de muerte celular.

## EXPERIENCIA N°4

### COLONIAS ERITROIDES CFU-E Y BFU-E POS CPA

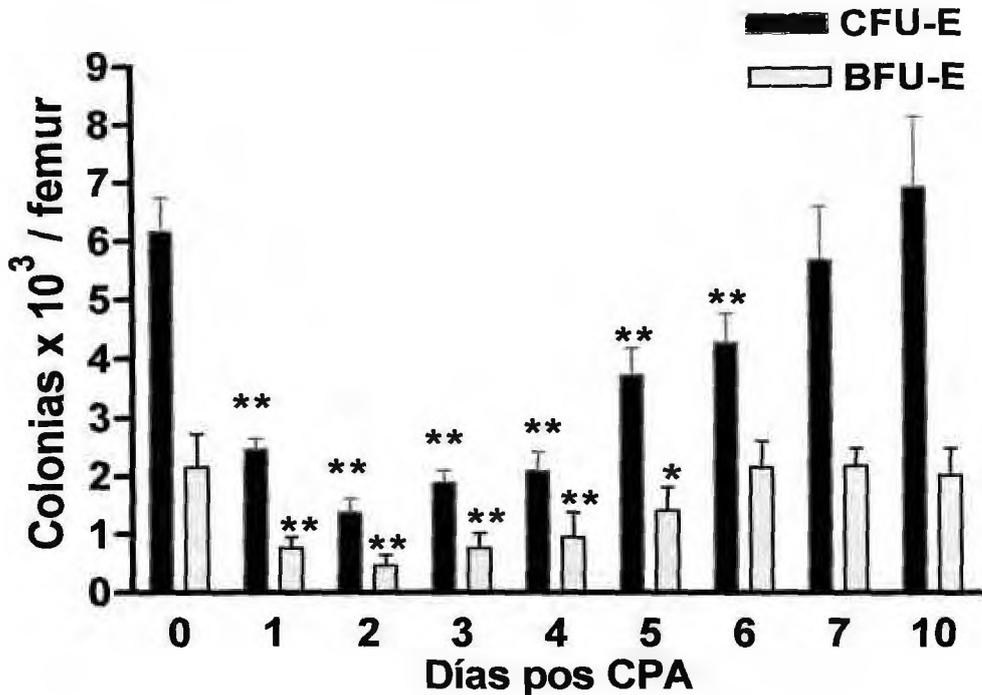


FIGURA N° 4 ENSAYOS CLONOGENICOS

Para analizar el efecto de la CPA sobre los progenitores eritroides fueron usados cultivos semisólidos de metilcelulosa. Una suspensión celular de MO ( $2 \times 10^5$  células/ml) obtenidas a cada día del esquema experimental fueron sembradas como se describe en Materiales y Métodos. Se diferenciaron unidades formadoras de colonias eritroides tempranas (BFU-E) y tardías (CFU-E). Estas colonias fueron contadas a los 7 y 2 días de incubación respectivamente. Las barras representan el número de colonias  $\times 10^3$  por fémur (media  $\pm$ SEM) de tres diferentes ensayos. Las colonias BFU-E así como las CFU-E disminuyen sensiblemente los primeros días inmediatos a la injuria.

Estos resultados experimentales muestran que ambos progenitores presentan una sensibilidad diferencial a los efectos tóxicos de la CPA.

Gradualmente, a partir del día 4 comienza a recuperarse el número de colonias que retorna a los valores normales entre el 6 y 7 día. Al fin de la experiencia, ambos progenitores, BFU-E y CFU-E parecen haber restaurado al compartimento eritroide. \*  $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  indica diferencias significativas entre los grupos control (0 día) y los grupos tratados.

A fin de ilustrar la experiencia se muestran ambos tipos de colonias.



**BFU-E**



**CFU-E**

Conviene recordar las prevenciones de Metcalf respecto a la microheterogeneidad celular. Las colonias formadas por los progenitores eritroides varían ampliamente en forma y tamaño, así como en el tiempo de aparición de los clusters eritroblásticos, proveyendo un criterio operacional para distinguir progenitores eritroides según su estadio de diferenciación.

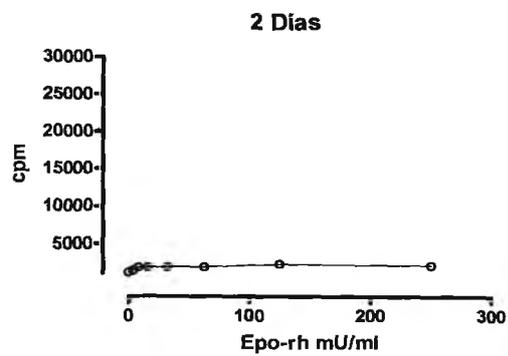
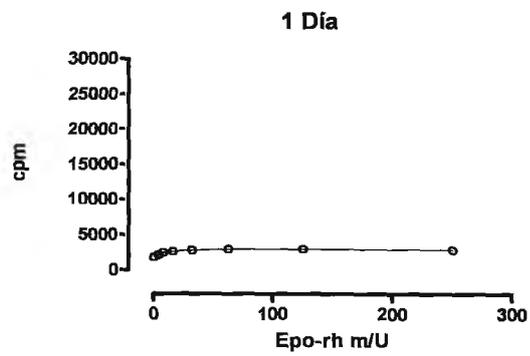
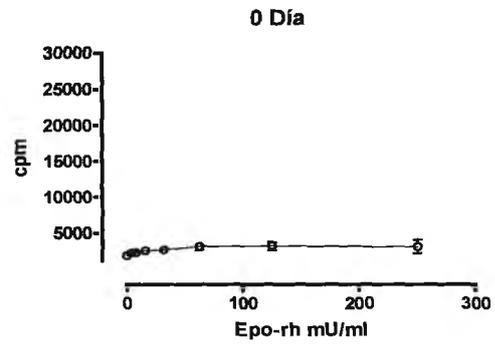
Las BFU-E (burst forming unit eritroides), son los más primitivos progenitores comprometido con el linaje eritroide. Se reconoce como tales a colonias eritroides murinos, conteniendo aproximadamente 50 o más eritroblastos que aparecen después de 7 o 10 días de cultivo (de 17 a 20 días las humanas). Estas células dan origen a una dispersa colección de pequeños racimos de células eritroides (burst). La aparición de estos burst implica un periodo inicial de proliferación celular y si bien requieren la presencia de EPO, la sensibilidad a la hormona aumenta a medida que avanza la diferenciación. El número de receptores de EPO se incrementa de BFU-E a CFU-E. Otros factores de crecimiento tales como IL3, GM-CSF y SCF también actúan sobre esta población.

Las CFU-E (Colony forming unit eritroide), son colonias eritroides formadas por mas de 8 eritroblastos madurando. Aparecen a los dos días de cultivos y sus células derivan del mas diferenciado tipo de progenitores eritroides. Se dividen rápidamente y responden a bajas concentraciones de EPO (15 a 20 mU/ml

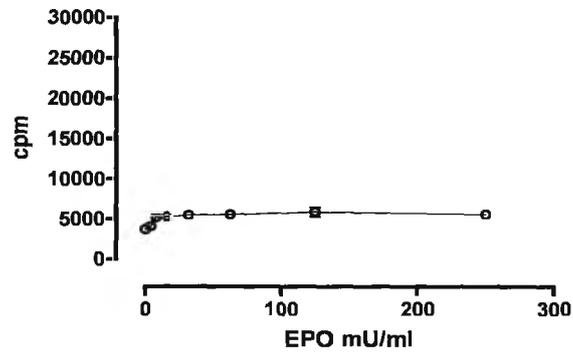
Morfológicamente pueden diferenciarse distintos tipos de colonias tanto CFU-E como BFU-E, pueden aparecer rojas, decoloradas o heterogéneas, según avanza el proceso de hemoglobinización. Además pueden presentar un aspecto de mayor o menor densidad, por lo que se las diferencia en compactas, difusas, multicéntricas o multifocales, según presenten uno o mas núcleos de condensación, cercados con un halo periférico común, creciendo a igual profundidad en la placa. Las colonias multifocales son agregados e muchas colonias o clusters, con o sin halo periferico (Marleba I. y col., 2004)

## EXPERIENCIA N° 5

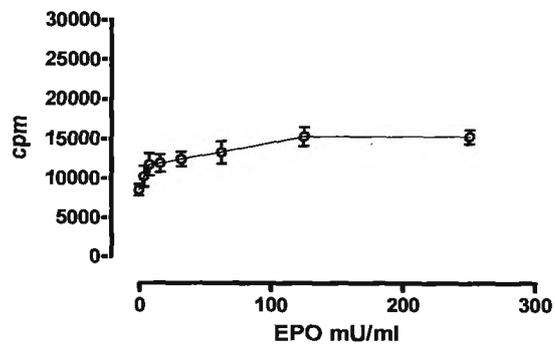
### PROLIFERACIÓN EN MO POS CPA



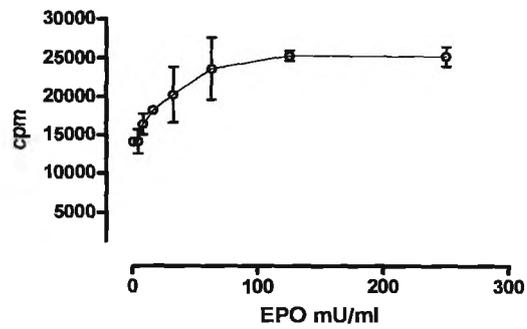
### 3 Días



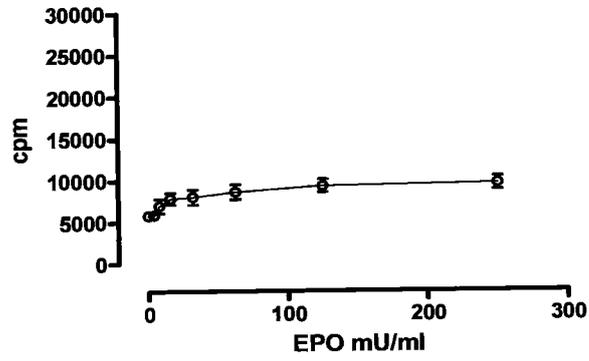
### 4 Días



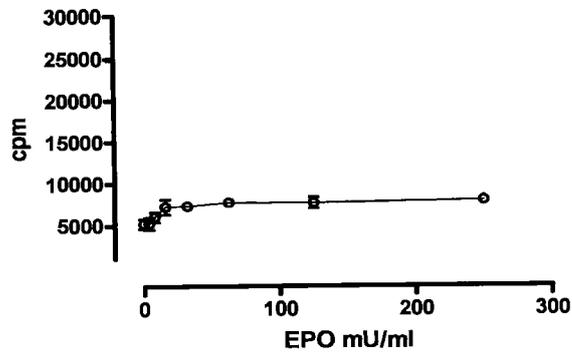
### 5 Días



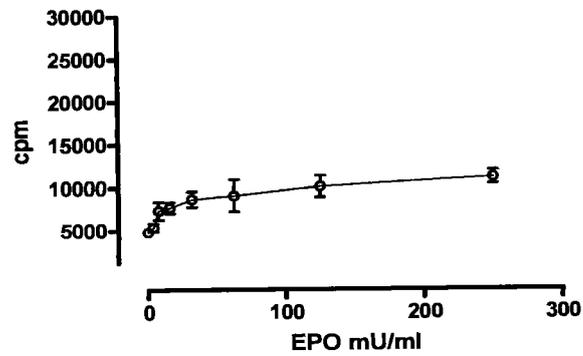
### 6 Días



### 7 Días

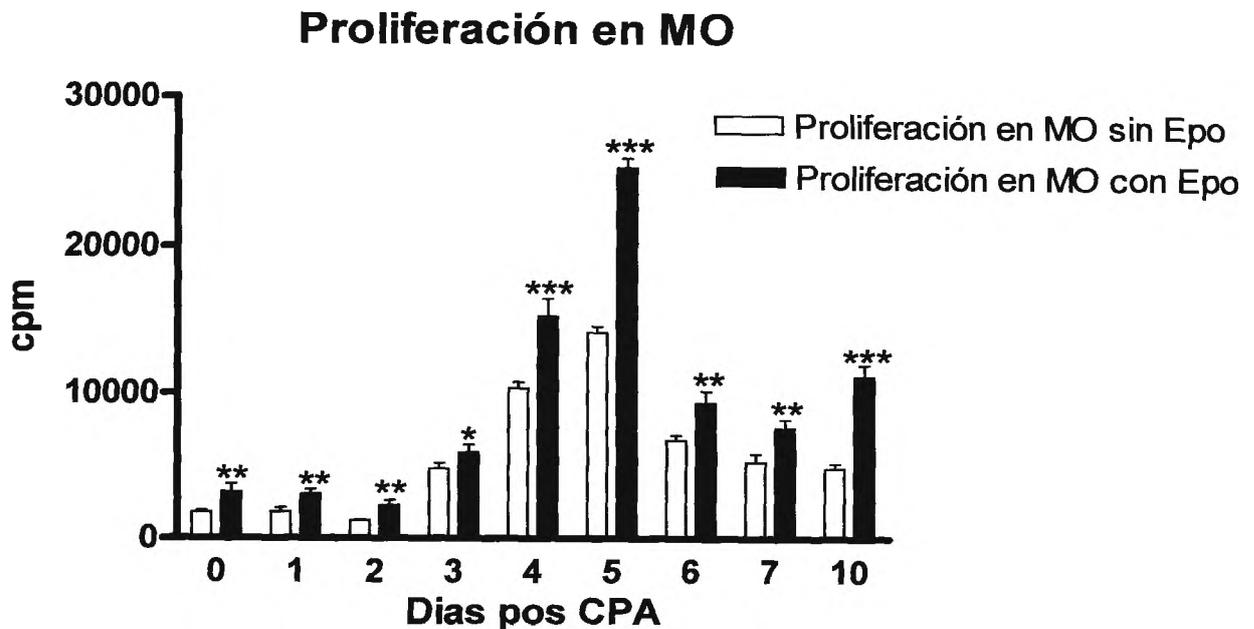


### 10 Días



**FIGURA 5. RESPUESTA PROLIFERATIVA DE M.O POS CPA.**

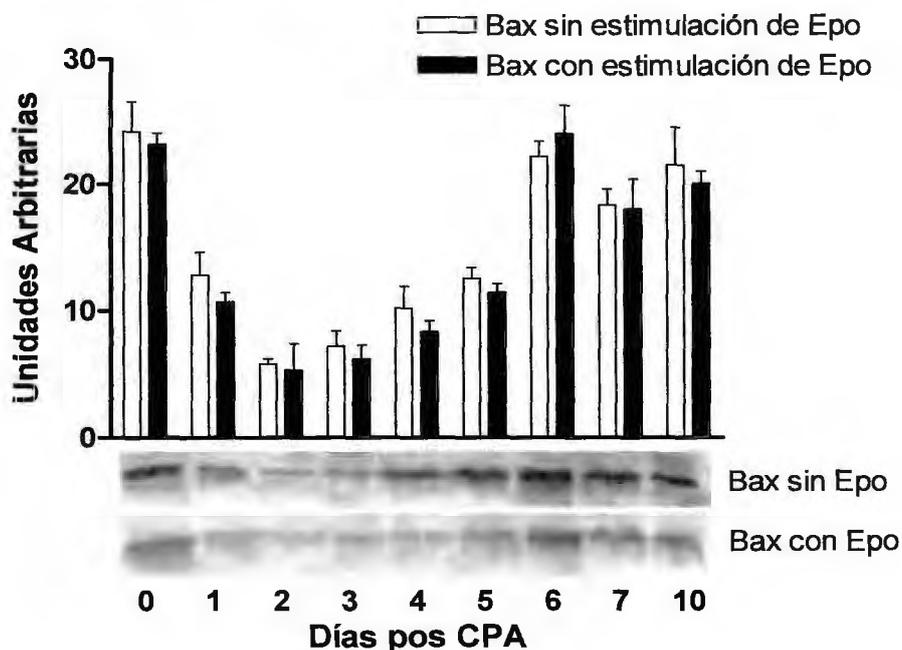
Los gráficos anteriores muestran la variación de la respuesta proliferativa de las células de M.O durante la reequilibración homeostática después de la injuria citotóxica. La proliferación se evalúa por la incorporación de Timidina tritiada al ADN de  $4,5 \times 10^6$  células, incubadas en medio defectivo de ribosidos, tal como se describe en materiales y metodos y con concentraciones crecientes de EPO (0-250 mU/ml). Observese la débil respuesta proliferativa los dos primeros días después de la aplicación de CPA. Esta escasa proliferación muestra un sostenido estado de quiescencia de los progenitores y puede interpretarse como un mecanismo de protección de los mismos mientras persista la noxa. Entre el 4 y 5 día la proliferación se incrementa y es máxima, aún sin ninguna o con una mínima presencia de EPO. En la siguiente figura se compara la respuesta entre 0 y 125 mU/ml de EPO, concentración suficiente para alcanzar la máxima respuesta en estas condiciones experimentales.



**FIGURA N° 6 .** Se esquematiza el perfil proliferativo de células murinas de M.O., en ausencia (barras blancas) o presencia (barras grisadas) de EPO (125 mU/ml). Un patrón similar se observa en ambas condiciones, la síntesis de ADN se incrementa drásticamente a partir del día 3 después de un periodo de respuesta reducida (día 1 y 2 pos CPA). Es remarcable que durante todos los días del ensayo, las células cultivadas en presencia de EPO, muestran un incremento significativo de la proliferación respecto de las cultivadas sin EPO. Esta respuesta es máxima el día 5 donde alcanza casi 8 veces los valores control. Luego, la tasa de proliferación decrece, aunque permanece por encima de los valores basales hasta el fin de la experiencia. Evidentemente, alrededor del quinto día después de la injuria las condiciones microambientales han cambiado y ahora favorecen la proliferación. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se expresan como cpm (media  $\pm$  SEM) \*\* P < 0.01 indica diferencia significativa entre los grupos tratados con CPA y los grupos control (0 día), con o sin estimulación con EPO

## EXPERIENCIA 6

### Expresión de Bax con y sin estimulación de Epo



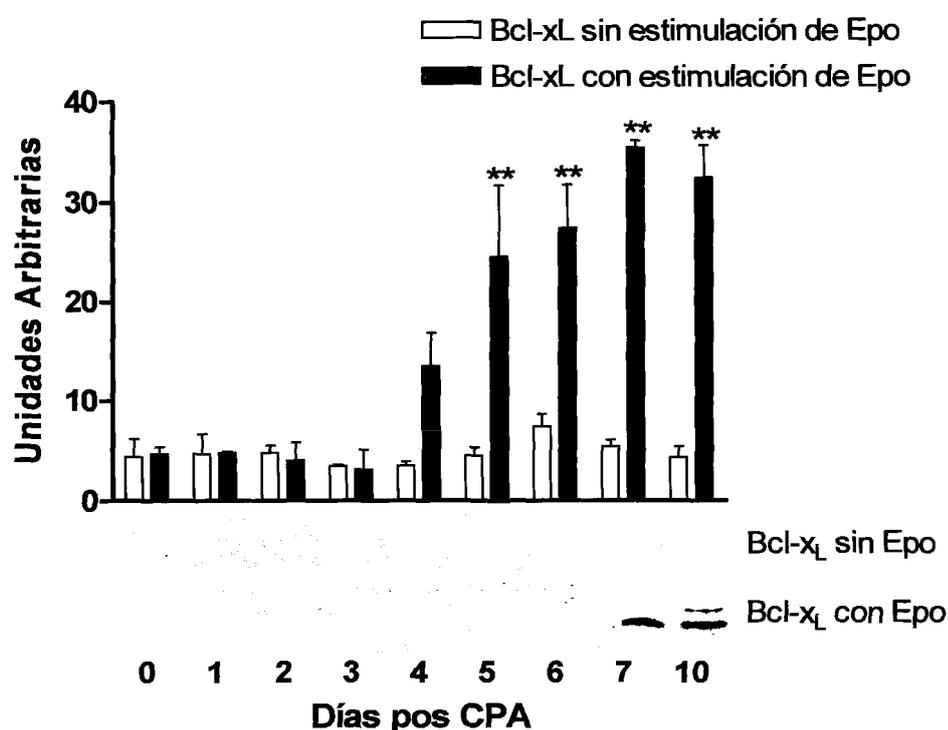
**FIGURA 7 EFECTO DE CPA SOBRE LA EXPRESION DE BAX EN CELULAS DE M.O.**

Células de MO murina fueron aisladas después de la inyección de CPA, cada día del esquema experimental, incubadas durante 2 horas con (barras grises) y sin (barras blancas) EPO (2UI/ml) y tratadas como se describe en “Materiales y Métodos”. Proteínas del lisado celular (40 µg/línea) fueron analizadas por Western blottings. Las barras representan, en Unidades Arbitrarias (media ± SEM), la expresión de Bax en cuatro corridas. Se muestra un blots representativo.

Bax es observable durante todo el periodo de estudio, mostrando una ligera disminución de su expresión durante el periodo agudo de la injuria citotóxica. A partir del día 5 retorna a los valores control. Su perfil es similar tanto en presencia como en ausencia de la estimulación con EPO. \*\*P < 0.01 indica diferencias significativas en la expresión de Bax entre el control y cada uno de los días del estudio.

## EXPERIENCIA 7

### Expresión de Bcl-x<sub>L</sub> con y sin estimulación de Epo



**FIGURA 8 EFECTO DE CPA SOBRE LA EXPRESION DE Bcl-x<sub>L</sub> EN CELULAS DE M.O.**

Células de MO murina fueron aisladas después de la inyección de CPA, a cada día del esquema experimental, incubadas durante 2 horas con (barras grises) y sin (barras blancas) EPO (2UI/ml) y tratadas como se describe en Materiales y Métodos. Proteínas del lisado celular (40 µg/línea) fueron analizadas por Western blottings. Las barras representan, en Unidades Arbitrarias (media ± SEM), la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> en cuatro corridas. Se muestra un blots representativo.

Las expresión de Bcl-x<sub>L</sub> no fue observable en ningún día de la recuperación espontánea. Sin embargo, la incubación con EPO induce una fuerte expresión de Bcl-x<sub>L</sub> a partir del día 5 y hasta el fin de la experiencia. \*\*P < 0.01 indica diferencias significativa en la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> entre el control y cada uno de los días en estudio.

El efecto antipoptótico de Bcl-xL, tanto sobre las células rojas primitivas como sobre las maduras, es bien conocido. (Gregory y col., 1999; Motoyama y col., 1999). Además, se acepta que durante la maduración eritroide, es EPO la que regula el número de células rojas, a través de la inhibición de la apoptosis. El mecanismo reconocido, es una acción directa sobre la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xL (Dolzing y col., 2001). Por otro lado, distintos estudios han mostrado que son las variaciones de la relaciones entre los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2, más que el valor absoluto del nivel expresión de uno cualquiera de ellos, lo que determina el destino celular. (Zhang y col., 2000).

Bcl-xL, que sin estimulación con EPO, no se expresa en los lisados de MO después de la administración de CPA; es fuertemente sobre-expresada por la estimulación “ex vivo” con EPO ( $P < 0.01$ ), desde el día 5 y hasta el fin de la experiencia, modificando drásticamente la relación Bax/Bcl-xL. Interesa señalar que este resultado, coincide temporalmente con la sobre-expresión de EPO-R en las células estimuladas a partir del quinto día. Esto parece mostrar que el estrés eritroide, liga la expresión de Bcl-xL a la activación de EPO-R

Resumiendo, la particular secuencia de procesos que preside la recuperación del compartimento eritroide es claramente observada cuando las células son estimulados “ex vivo” con EPO. La sobre expresión de EPO-R observada desde el quinto día y el progresivo incremento de la expresión de Bcl-xL indican la predominio de los mecanismos antiapoptóticos. Según estos resultados, EPO garantiza la sobrevivencia celular regulando la expresión de EPO-R y Bcl-xL.

EXPERIENCIA 8

Expresión de Epo-R con y sin estimulación de Epo

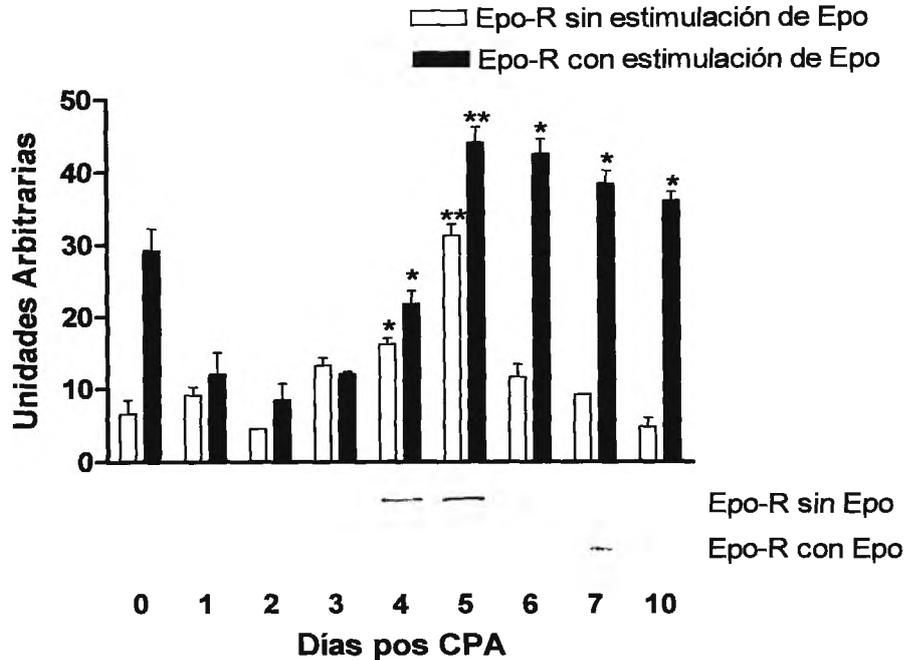
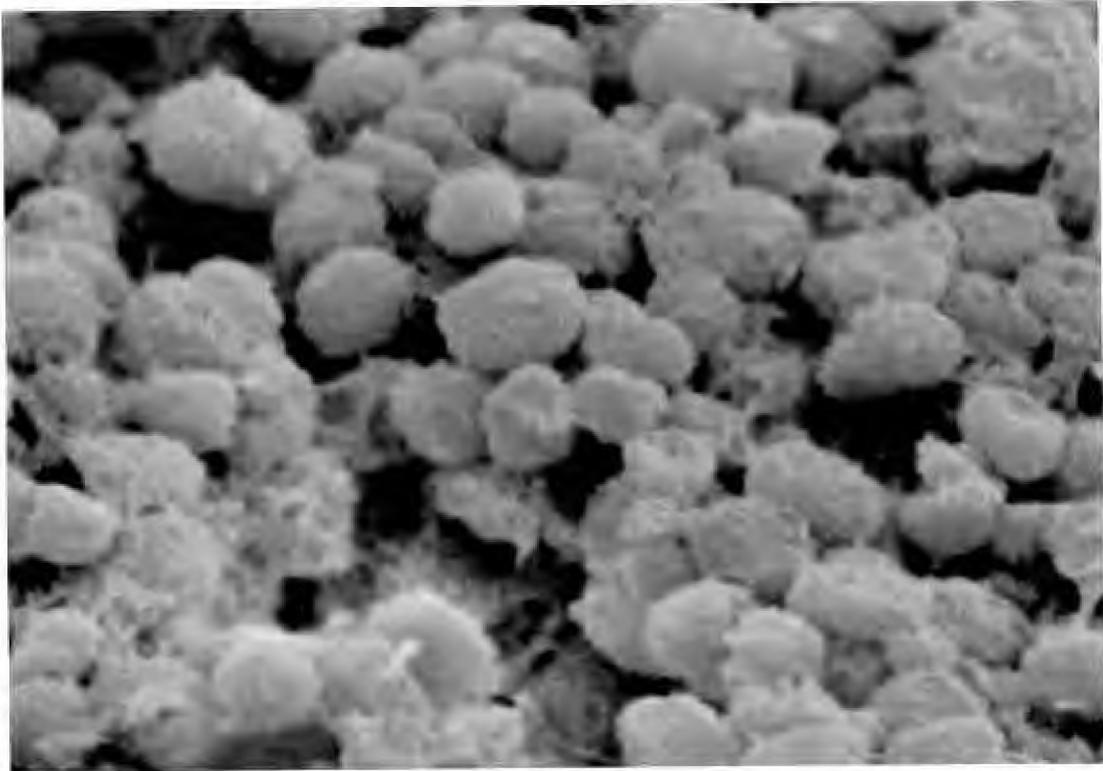


FIGURA 9 EFECTO DE CPA SOBRE LA EXPRESION DE EPO-R EN CELULAS DE M.O.

Células de MO murina fueron aisladas después de la inyección de CPA, a cada día del esquema experimental, incubadas durante 2 horas con (barras grises) y sin (barras blancas) EPO (2UI/ml) y tratadas como se describe en Materiales y Métodos. Proteínas del lisado celular (40 µg/línea) fueron analizadas por Western blottings. Las barras representan, en Unidades Arbitrarias (media ± SEM), la expresión de EPO-R en cuatro corridas. Se muestra un blots representativo.

Durante la recuperación espontánea, EPO-R solo es detectable los días 4 y 5 después del citotóxico. En las células estimuladas, EPO-R es fuertemente expresado en las células normales (día 0), débilmente detectable los días 1 y 4 y fuertemente sobre expresada desde el día 5 hasta el fin de la experiencia. \* P < 0.05 y \*\* P < 0.01 indican diferencia significativa entre el grupo control (0día) y los animales tratados con CPA, tanto para las células estimuladas o no con rh-EPO.

Los datos parecen mostrar que después de la administración de CPA, un proceso inhibitorio, impide la expresión de EPO-R; y ni aún, la incubación con altas concentraciones de EPO pueden revertir este efecto. Se acepta que los citotóxicos inducen la liberación TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL1, moléculas proinflamatorias y secundariamente Mip  $\alpha$  y IFN $\gamma$ , citoquinas capaces de disminuir la proliferación eritroide (Allen D.A. y col., 1991, Robertson, J.D y col. 2000). Aparentemente este efecto inhibitorio estaría destinado a mantener los progenitores en estado de quiescencia de a fin de protegerlos hasta tanto se metabolice la noxa.



## **DISCUSSION**

## DISCUSIÓN

En la práctica clínica, el limitante de dosis de las agentes alquilantes es la mielo supresión. Sin embargo, en rigor, esta supresión incluye a todos los elementos formes de la sangre, leucocitos, plaquetas y células rojas. Es más, al parecer los progenitores eritroides son la población mas sensible a los xenobióticos (Gribaldo y col. 2000; Maricba y col. 2002). Concretamente, "in vitro", CPA es significativamente mas tóxica para el compartimiento rojo, mostrando una acción particularmente selectiva sobre los progenitores eritroides, afecta mas a BFU- E que a CFU-E y a ambos, mas que a los progenitores mixtos CFU-GM (Maricba y col. 2004). Aunque "in vivo" no hay cambios observables en los parámetros periféricos, esto se logra por una profunda reorganización del compartimiento eritroideo

Los mecanismos por los cuales CPA interfiere en la producción de las células sanguíneas, no son todavía completamente conocidos. Específicamente, se desconoce si cuando la quimioterapia induce anemia, esta resulta de una generalizada supresión de la hematopoyesis en MO, a una acción específica a nivel del compartimiento de progenitores, o si bien, son los precursores eritroides los directamente alcanzados por los efectos tóxicos de CPA. (Zcuner, A. y col. 2003). Pero si la acción de esta droga todavía plantea interrogantes, de que manera la homeostasia tisular es restaurada y sostenida después de la injuria, es aún menos conocida. En general, la recuperación del compartimiento eritroide es un asunto poco considerado. Además, una gran mayoría de los estudios acerca de la citotoxicidad de CPA, se realizaron en líneas celulares, con las naturales dificultades para extrapolar sus resultados al animal entero. Es por estas razones, que decidimos enfocar la atención sobre los efectos de una simple dosis de CPA sobre la eritropoyesis marina, analizando "in vivo" la recuperación de MO hasta 10 días después de la injuria.

Para esto se realizaron una serie de estudios sobre la organización de MO, la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular, así como sobre los perfiles de expresión de proteínas relacionadas con el compartimiento rojo.

Los cambios observados en la dinámica de estos procesos, concretamente en la expresión de estas proteínas, pone en evidencia la complejidad de las regulaciones

locales y sistémicas, comprometidas en la recuperación de este compartimiento después de la injuria.

Como es sabido, CPA ejerce una acción citotóxica directa, por sus efectos alquilantes, sobre el ADN y por su acción como agente peroxidante, sobre los lípidos de membrana. De manera que la apoptosis y la necrosis son efectivamente disparadas en M.O. inmediatamente después de su aplicación ( Mazur y col., 2002). De esto resulta que el efecto inmediato, es la depleción de la celularidad. Se reconoce que una masiva reducción en el número de las células hematopoyéticas, ocurre a partir de doce horas después de la inyección de CPA, con restauración de la normalidad después de 10 días. (Anton, 1997). Las imágenes con la microscopia electrónica de barrido, muestran claramente la disrupción de la arquitectura de MO, con una obvia alteración de todas las interacciones microambientales. El daño directo de la droga sobre la membrana plasmática, es asumido como necrosis. Esta desorganización de MO es máxima al segundo día pos CPA y morfológicamente, una aparente normalidad parece recuperarse después del quinto día

Sin embargo, la recuperación funcional de MO es, al parecer, más compleja. CPA puede causar un daño residual sobre la hematopoyesis por su efecto sobre las células estromales. Esta lesión persiste al menos durante 6 semanas, si se evalúa la capacidad femoral de soportar el crecimiento de CFU-S después de la injuria. (Kalechman y col., 1993). De acuerdo con esto y en relación a nuestros datos, es esperable que, aunque al fin de la experiencia estructuralmente MO parece haberse recuperado, el daño funcional persista.

Adicionalmente, se sabe que estos eventos injuriantes están asociados con la expresión de moléculas proinflamatorias (TNF e IL-1), acompañados con la liberación secundaria de mediadores de la inflamación (Mip e IFN- $\gamma$ ), responsables de severas alteraciones en la proliferación de los progenitores. Una abundante evidencia experimental ha mostrado que CPA es capaz de inducir la producción de óxido nítrico (Pelaez y col., 2001), la liberación de interferon-gamma (Schiavoni y col., 2000) y el factor de necrosis tumoral (Othami y col., 2006).

Todos ellos, reguladores negativos de EPO y EPO-R. Es razonable entonces,

atribuir a la liberación de estas citoquinas, la retracción de la eritropoyesis, evidente durante los primeros días de la injuria. Las observaciones mencionadas, son consistentes con la reducida magnitud de las respuestas medulares en los ensayos proliferativos, el limitado crecimiento de las colonias BFU-E y CFU-E o la disminuida expresión de EPO-R

Además, hemos observado una fuerte reducción de la síntesis de hemoglobina por la inyección de CPA. Hay una marcada restricción del proceso madurativo, evidenciable en la disminuida incorporación de  $Fe^{59}$  a MO. La captación del isótopo cae continuamente, desde el 11% del total inyectado, en el animal normal, hasta alcanzar el 3%, 10 días después de la injuria. Si nos atenemos a este parámetro, la normalización de la síntesis de hemoglobina, la recuperación medular se registra a partir del día 14 pos CPA (Aguilre, M.V. y col., 1999)

La apoptosis ha mostrado ser un importante proceso regulatorio de la eritropoiesis (Koury y col., 1994); hemos analizado este proceso por la técnica TUNEL y seguidamente, por la relación entre las proteínas Bax y Bcl-xL consideradas apoptótica y antiapoptótica respectivamente. Se ensayó tanto sobre células en recuperación espontánea, como en células estimuladas "ex vivo" con EPO.

Se acepta que es la relación entre los factores de sobrevivencia y muerte, lo que decide el destino celular. Pero particularmente, son las variaciones en la expresión de Bcl-xL, lo que modifica esta relación y marca el predominio de uno u otro fenómeno (Zhang y col., 2000). En este estudio, el porcentaje máximo de apoptosis se registra al segundo día después de la injuria, comenzando luego a disminuir hasta alcanzar valores normales al quinto día. Cuando se analiza la expresión de Bcl-xL durante el periodo agudo de la apoptosis (entre 1 y 4 días post-CPA) no se observa diferencia alguna entre las células que fueron o no, estimuladas con EPO. Es decir, durante este periodo, ni siquiera la incubación con altas concentraciones de hormonas, son suficientes para modificar la expresión de Bcl-xL y por ende el destino celular.

Mientras tanto, los cambios en la expresión de Bax, fueron menos notorios que los observados en las proteínas antiapoptóticas y absolutamente independientes de la estimulación con EPO. Pero conviene recordar, que los mecanismos por los cuales, los

cambios en la expresión de Bax, se relacionan con el programa de sobrevivencia o muerte celular, son controversiales (Josefsen y col., 2000).

Al día 4 y 5 después de la injuria, hay una notable diferencia en el perfil de expresión de EPO-R y Bcl-xL, según que las células hayan sido o no, estimuladas con EPO. Por un lado, en la recuperación espontánea, solo durante esos días EPO-R es detectable, mientras Bcl-xL no lo es nunca. Por otro, en las células estimuladas, hay una sobreexpresión del primero al día 0 y de ambos, EPO-R y Bcl-xL, a partir del quinto día y hasta el final de la experiencia.

Además, esta sobre expresión de EPO-R, coincide temporalmente con el incremento de la capacidad proliferativa de las células de MO, registrada en los ensayos de incorporación de Timidina y con el crecimiento de las colonias BFU-E y CFU-E. Aparentemente, a este tiempo de la experiencia, las condiciones microambientales endógenas de MO aparecen suficientes como para soportar la eritropoyesis. Estos resultados interesan: primero, porque muestran que Bcl-xL es un muy importante blanco de las señales que resultan de la activación de EPO-R, lo que es consistente con otros trabajos, (Lin y col., 1996; Gregory y col., 1999; Silva y col., 1999 a y b) y segundo, porque explican a la clínica, al menos en parte, las no siempre lineales respuestas a la aplicación de EPO.

Probablemente este sea el resultado más significativo de toda la experiencia; la evidencia de la dependencia de EPO de ambas moléculas, EPO-R y Bcl-xL; la forma en que el estrés eritropoyetico liga segunda a la activación de la primera y como estos mecanismos son condicionados por las condiciones microambientales.

En conclusión, la eritropoyesis es particularmente afectada por la CPA. Máxima apoptosis con mínima celularidad y una severa alteración del nicho medular se registra al segundo día de la experiencia. Durante la recuperación espontánea, la expresión de EPO-R se detecta al cuarto y quinto día. En las células estimuladas "ex vivo" con EPO (2 U/ml), EPO-R esta sobreexpresado a lo largo de todo el estudio, excepto entre el primero y el cuarto día. Bax es observable a lo largo de toda la experiencia, con y sin estimulación con EPO. Mientras Bcl-xL, indetectable sin estimulación, su expresión se incrementa gradualmente a partir del quinto día, cuando las células son estimuladas.

Estos resultados muestran una drástica reducción de la actividad eritropoyética inmediatamente después de la injuria, seguido por la recuperación de la capacidad proliferativa, entre el cuarto y el quinto día, y por la de los progenitores, BFU-E y CFU-E, a partir del sexto y séptimo día respectivamente.

Todo lo anterior sugiere, que la recuperación de la MO después de la injuria, pone en marcha un sistema autorregulado, capaz de reducir fuertemente la proliferación celular mientras persiste la noxa, preservando así, el pool de células hematopoyéticas multipotentes. Solo una vez que el tóxico ha sido metabolizado, se acelera el proceso de recuperación. La evidencia experimental parece mostrar que durante esta reequilibración, la regulación interna del compartimiento eritroide, esta fundamentalmente mediada por la expresión de EPO-R.

Se acepta que los precursores tardíos son EPO independientes. De manera que la función esencial de EPO-R en la formación de células rojas, está entonces limitada, a un restringido número de progenitores, desde BFU-E hasta los eritroblastos basófilos. En condiciones de eritropoyesis basal, esa estrecha ventana constituye el principal blanco de EPO. Sin embargo, hay claras evidencias que en respuesta al estrés, EPO ejerce su acción sobre un amplio espectro de progenitores. Ocurre que EPO-R aumenta su expresión, en forma retrograda, hasta los progenitores hematopoyéticos más tempranos, incluidos los S.C.. Además, tanto el número de BFU-E como de CFU-E se incrementan significativamente. (Socolovsky, 2007) Esto puede explicar el perfil de expresión de EPO-R durante la reequilibración de su estado estacionario.

## **BIBLIOGRAFIA**

Allen D.A., Breen C, Yagoob M.M, Macdougall I.C. (1999) Inhibition of CFU-e colony formation in uremic patients with inflammatory disease: role of INFgama an TNF alfa J Investig Med. may:47 (5) 204-11

Aggio MC, Fernández LM, Bruzzo MT, Alperín M.(1974) The effect of a single large dose of cyclophosphamide on erythropoiesis and iron metabolism in mice. Can J Physiol Pharmacol.; 52: 240-7.

Aguirre MV, Juaristi JA, Alvarez MA, Carmuega RJ, Brandan NC. (1999) In vitro and in vivo study of murine erythroid recovery after cyclophosphamide treatment. Sangre (Barcelona) 1999; 44: 182-7.

Aguirre MV, Juaristi JA, Alvarez MA, Brandan NC.(2005) Characteristics of in vivo murine erythropoiesis response to sodium orthovanadate. Chem-Biol Interact. ; 156: 55-68.

Anton E. (1997) Ultrastructural changes of stromal cells of bone marrow and liver after cyclophosphamide treatment in mice. Tissue cell ; 29: 1-9.

Bauer, A; Grandillon, O; and Samarut, J. (2000) Nuclear receptors in hematopoietic development: Cooperation with growth factor receptors in regulation of proliferation and differentiation . Hematopoiesis- A developmental approachs Ed L.I.Zon. Oxford University press

Blankenberg FG, Naumovsky L, Tait FJ, Post AM, Straus HW. (2001) Imaging cyclophosphamide-induced intramedullary apoptosis in rats using <sup>99m</sup>Tc radiolabeled annexin V J Nucl Med; 42 :309-16

Bozzini C.E; Alippi R.M; Barcelo A.C; Conti M.I Bozzini C; Lezon C.E. and Olivera M.I. (1992) The biology of stresserythropoiesis and erythroopoietin production. Annals of New York Academy of Sciences. Vol 718 – pag183-93

Bradley T and Metcalf D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. Aus. J Exp. Biol. Med. Sci. 44: 287-300.

Brandan NC, Cotes PM, Espada J. (1981) In vitro bioassay for erythropoietin in fetal mouse liver culture. I. Comparison of radioactive tracers and evidence of assay specificity. Br J Haematol; 47: 461-8.

Capizzi R.L. and Agrawal K(1992) Drugs useful in the chemotherapy of the acute leukemias. Fisher J.W ed. Tulane University

Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. Ann Rev Immunol 1998 ; 16:39, 5-419

Charbord Pierre. (2001a). **Microenvironmental cell populations essential for the support of hematopoietic stem cells.** L.I.Zon Oxford University Press

Charbord Pierre, (2001b). **Mediators involved in the control of hematopoiesis by the microenvironment.** L.I.Zon Oxford University Press

Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. (1999). **In vivo proliferation and cell cycle kinetic of long-term self-renewing hematopoietic stem cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 3120-3125.

David M; Petricoin,E; Benjamin C; Pine R; Weber M.J; and Parmer A.C. (1995) **Requirement for MAPKinase (ERK2) activity in interferon alpha and interferon beta stimulated gene expression through STAT proteins.** Science 269; 1721-1723

Dai C, Krantz SB. (1999) **Interferon gamma induces up regulation and activation of caspases 1, 3 and 8 to produce apoptosis in human erythroid progenitor cells.** Blood ; 93: 3309-16.

De Haan, D; Dontje, B; and Nijhof. (1996) **Concepts of hemopoietic cell amplification. Synergy, redundancy and pleiotropy of cytokines affecting the regulation of erythropoiesis.** Leukemia and lymphoma. Vol 22, pp 385-396.

de Vries P, Singer JW. (2000) **Lisophylline suppresses ex vivo release by murine spleen cells of hematopoietic inhibitors induced by cancer chemotherapeutic agents.** Exp Hematol; 28: 916-23.

Diggs, L.W, Sturm D., and Bell A., (1978) **The morphology of human blood cells** University of Tennessee Fourth Edition

Domen J. (2000 a) **The role of apoptosis in regulating hematopoiesis and hematopoietic stem cells.** Immunol Res.; 22, 83-94.

Domen, J; Cheshier, S.H; Weissman, I.L. (2000 b) **The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic Stem Cells: over expression of Bcl-2 increases both their numbers and repopulation potential** JEM on line 191 (2): 253

Dominici M., Pritchard C.,Garlits J.E., Hofman T.J., Pearson D.A., Horwitz EM. (2004) **Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation.** Proc. Natl.Acad. Sci. USA 101:11761-11766

Eschbach JW. (1990). **Treatment of the anemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin.** Ann. Rev. Med. 41:349-360.

Espada J, Gutnisky A. (1970). **A new method for concentration of erythropoietin from human urine.** Biochem. Med. 3: 475-483.

Erslev A. (1953). **Humoral regulation of red cell production.** Blood 8: 349-357.

Erslev AJ, Gabuzda TG. (1985). **Pathophysiology of Blood, 3<sup>rd</sup> Ed.** Philadelphia: WB Saunders. 28-134.

Fisher JW. (2003). Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med.* (Maywood); 228: 1-14.

Fraiser LH, Kanekal S, Kehrer JP. (1991) Cyclophosphamide toxicity. *Drugs*; 42:781-95

Fraser CC, Szilvazzy SJ, Eaves Cj, Humphries RK (1992). Proliferation of totipotent hematopoietic stem cells in vitro with retention of long-term competitive in vivo reconstitutions ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1968-1972.

Fredrickson T.N. and Harris A.W.(2000) Atlas of Mouse Hemopathology. Harwood Academic publishers

Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P., Schmidt L.H., Skipper H.E. (1966). Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. *CancerChemother. Rep* 50 (4): 219- 244.

Fukada T., Ohtami T., Yoshida Y., Shirogame T., Nishida.K.; Nakajima K, Hibi M., and Hirano T. (1998) STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J.*17: 6670-6677

Goodman y Gilman (1996) Bases farmacológicas de la terapeutica McGraw-Hill Interamericana 9 ed Vol II:1309-1320

Grandillon, O.(2001) Signaling cross-talk, celular identities and leukemogenesis understanding and manipulating the self-renewal of chicken erythrocytic progenitors cells. Ed L.I.Zon, Oxford University press

Gregoli PA, Boundurant MC. (1997) The roles of Bcl-X (L) and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood*; 90: 630-40.

Gregory CJ, Eaves AC. (1978). Three stages of erythropoietin progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biological properties. *Blood* 51: 527-540.

Gregory, T; Cho Ming Yu, Averil M.A; Orkin S. H; Blabel G.A, and Weiss M.J Gata-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating Bclxl expression. *Blood*, Vol 94 1999. pp 87-96

Guilliam May and Tariq Enver (2000) The lineage Commitment and self-renewal of blood stem cells. Hematopoiesis. A developmental approachs Ed L.I. Zon Oxford University press

Iscoe NN, Messner H, Till JE, McCulloch EA. (1972). Human marrow cells forming colonies in culture: analysis by velocity sedimentation and suspension cultures. *Sem. Haematol.* 5: 37-49.

Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ.(2001). Autocrine/paracrine mechanism in human hematopoiesis. *Stem Cells* 19: 99-107.

Jelkmann W. (1998) Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J. Interferon Cytokine Res*; 18: 555-9.

Johnson CS, Cook CA, Furmanski P.(1990) In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis-factor- alpha (TNF-alpha): reversal with exogenous erythropoietin (EPO). *Exp. Hematol*; 18: 109-13.

Jordan JD, Landau EM, Iyengar Y. (2000). Signaling networks: The origins of cellular multitasking. *Cell* 103: 193-200.

Josefsen D, Myklebust JH, Lomo J, Sioud M, Blomhoff HK, Smeland EB. (2000) Differential expression of Bcl-2 homology in human CD 34<sup>+</sup> hematopoietic cells induced to differentiated into erythroid and granulocytic cells. *Stem Cells* ; 18: 261-72.

Jovasevic MV, Mokyr MB.(2001) Melphalan-induced expression of IFN-beta in MOPC-315 tumor bearing mice and its importance for the up-regulation of TNF alpha expression. *J Immunol* 2001; 167: 4895-901.

Juaristi JA, Aguirre MV, Carmuega RJ, Romero-Benitez M, Alvarez MA, Brandan NC.(2001) Hematotoxicity induced by paclitaxel: in vitro and in vivo assays during normal murine hematopoietic recovery. *Meth Find Exp Pharmacol* ; 23:161-7.

Juaristi JA, Aguirre MV, Todaro, J.S, Alvarez MA, Brandan NC.(2007) EPO receptor, Bax and Bcl-xL expressions in murine erythropoiesis after cyclophosphamide treatment. *Toxicology* 231: 188-199

Kalechman Y, Sotnis-Barkai I, Albeck M, Sredni B. (1993) Protection of bone marrow stromal cells from the toxic effects of Cyclophosphamide in vivo and of ASTA-Z 7557 and Etoposide in vitro by ammonium trichloro (dioxethylene o-o) tellurate (AS101) *Cancer Res* ; 53: 1838-44.

Kelley LL, Koury MJ, Boundurant MC, Koury ST, Sawyer ST, Wikrema A.(1993). Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietic sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocytes production. *Blood* 82: 2340-2352.

Koishi Akoshi and Irwing Weissman.(2001) Stem cells and hematolymphoid development.- Hematopoiesis- A developmental approach Ed L.I.Zon. Oxford University press

Koury MJ, Boundurant MC. (1990). Erythropoietin retards DNA breakdown and prevent programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 248: 1449-1456.

Koury MJ, Kelley LL, Boundurant MC. (1994). The fate of erythroid progenitor cells. *Ann. NY. Acad. Sci. USA.* 718: 259-267.

Kroemer, G; El-Deiry, W.S.; Golstein, P; Peter, ME; Vaux,D; Vandenabeele, P; Zhivotovsky, B; Blagosklonny, MB; Malorni,M; Knight,RA; Piacentini,M;Nagata, S; and Melino G. (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*. 12: 1463-1467

Lappin T R, Maxwell P, Jhonston PG. (2002). Epo's alter-ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells* 20: 485-492.

Lemischka I, Raulet D, Mulligan R. (1986). Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 45: 917- 927.

Lemischka I. (1997). Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 15:63-68.

Lemischka I. (2001). Regulation of hematopoietic stem cells: some conceptual and practical considerations. In *Hematopoiesis: A Developmental Approach*, L I Zon ed. (Oxford University Press), pp. 48-60.

Lin CS, Lim SK, Agati V, Constantini F. (1996) Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption in primitive and definitive erythropoiesis. *Gene Dev*; 10: 154-64.

Loadman PM, Bibby MC. (1994) Pharmacokinetic drug interaction with cancer drugs. *Clin Pharmacokinet*; 26: 486-500.

Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. (2001). Numerous growth factors, cytokines and chemokines are secreted by human CD34<sup>+</sup> cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97: 3075-3085.

Majka M , Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschik K. (2003).Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J. Clin. Invest.* 111: 71-79.

Mang Xiao, Oppenlander B.K; and Dooley D, C. (2000) Transforming Growth factor Beta-1 induces apoptosis in CD34<sup>+</sup> CD 38<sup>-low</sup> cells that express Bcl-2 at low level *Experimental Hematology*

Marleba S, Casati C, Diodovich D, Parent-Massin , Gribaldo L. (2004) Inhibition of CFU-E/BFU-E and CFU-GM colony growth by Cyclophosphamide, 5-Flouracil and Taxol: development of a high-throughput in vitro method I. *Toxicology in vitro*; 18: 293-300.

Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW. y col.. (1993). Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int.* 41: 1149-1162.

Mazur L, Augustynek A, Bochenek M. (2002) Flow cytometric estimation of the plasma membrane diversity of bone marrow cells in mice treated with WR-2721 and Cyclophosphamide. *Toxicology*; 171: 63-72.

Rizzo JD, Lichtin AE, Wolf SH, Seidenfel J, Bennet CHL, Cella D, Djulbejovic B, Goode M, Jakubowsky AA, Lee S, Miller CB, Rarick MU, Regan H, Browman GP, Gordon MS. (2002). Use of epoetin in patients with cancer: evidence-based clinical practice guideline of American Society of Clinical Oncology and the American Society of Hematology. *Blood* 100: 2303-2320.

Robertson, J.D; and Orrenius, S. (2000) .Critical Reviews in toxicology Vol 30 Issues 5 pages 609-627

Romero Benítez M.M., Aguirre, M.V., Juaristi, J.A. Alvarez M.A., Trifaró J.M., Brandan N.C., 2004. In vitro erythroid recovery following Paclitaxel injury: correlation between GATA-1, c-MYB, NF-E2, Epo receptor expressions and apoptosis, *Toxicol. and Applied Pharmacol.* 194 : 230-238.

Schiavoni G, Mattei F, Di Picchio T, Santini SM, Bracci L, Belardelli F, Proietti E .(2000) Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44<sup>hi</sup> T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood.*; 95 : 2024-30.

Schobersberger W, Hoffmann G, Fandrey J. (1996) Nitric oxide donors suppress erythropoietin production. *Pflugers Arch.*; 432: 980-5.

Sefc L, Psenak D, Sykora V, Sulc K, Necas E. (2003) Response of hematopoiesis to cyclophosphamide follows highly specific patterns bone marrow and spleen. *J Hematother Stem Cells Res*; 12: 47-61

Sieweke, M.H; Graf, T. (1998) A transcription factor party during blood cell differentiation. *Current opinion in genetics & development.* 8:545-551

Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Daryoush E, Nuñez G, Fernández Luna JL.(1999 a) Erythropoietin can induce the expression of Bcl-x<sub>L</sub> through STAT-5 in erythropoietin dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem* ; 274 : 22165-9.

Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nuñez G, Fernandez Luna JL. (1999 b) Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through bcl-x<sub>L</sub> and Bcl-2. *Blood* ; 88: 1576-84.

Socolovsky M., Dusanter-Four I. and Lodish H.I.(1997) The prolactin receptor and severely truncated erythropoietin receptors support differentiation of erythroid progenitors. *J.Biol Chem.* 272:14009-14012

Socolovsky M., Lodish H.I. and Daley, G.Q. (1998) Control of hematopoietic differentiation: Jak of especificity in signaling by cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6573-6575

Socolovsky Merav (2007) Molecular insights into stress erythropoiesis. *Current opinion in hematology.* 12:215-224

Metcalf D, Nicola NA. (1995). The hematopoietic colony-stimulating factors. (Cambridge University Press). Melbourne, Australia pp. 48-69.

Metcalf D. (1998). Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood* 92:345-352.

Metcalf D. (2001). Some general aspects of hemopoietic cell development. In *Hematopoiesis: A developmental approach*, L I Zon ed. (Oxford University Press), pp. 3-14.

Migliaccio AR, Vannucchi AM, Migliaccio G. (1998) Molecular control of erythroid differentiation. *Int. J. Hematol.* 64: 1-29.

Miller K.L, Carlino J.A; Ogawa Y; Avis P.D; and Carrol K.G. (1992) Alteration in Erythropoiesis in TGF  $\beta$ 1 treated mice *Exp Hematol.* 20:951-956

Morrison S.J, Hemmati H.D; Wandicz A.M; and Weissman I.L. (1995) The purification and characterization of fetal liver hematopoietic Stem Cells. *Proc Natl Acad. Sci USA* 92:10302-10306

Othani T, Nakamura T, Furukawa F. (2006) Cyclophosphamide enhances TNF-alpha-induced apoptotic cell death murine vascular endothelial cells. *FEBS Lett.*; 580: 1597-1600.

Ogawa M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844-2853.

Pelaez, B., Campillo, J.A., Lopez-Asenjo, J.A., Subiza, J.A., 2001. Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by nitric-oxide-dependent mechanism. *J. Immunol.* 166, 6608-6615.

Peters, R; Leyvraz, S, (1998); Perey L Apototic regulation in primitive hemopoietic precursors *Blood Vol 92 Nro 6 pp 2041-2051*

Podesta F, Romero G, Liu W, Krajewski S, Reed JC, Gervandinger Ch., Lorenzy M. (2000) Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* ; 156:1025-32.

Pohlmann S.J; Slayton W.B and Spangrude G J; *Stem Cells populations : purification and behavoir* Ed L.I.Zon. Oxford University press 2001  
Robertson, J.D; and Orrenius, S. *Critical Reviews in toxicology Vol 30 Issues 5 (2000)* pages 609-627.

Ratcliffe PJ.(2002). From erythropoietin to oxygen: hypoxia-inducible factor hydroxylases and the hypoxia signal pathway. *Blood Purif.* 20: 445-450.

Spangrude G.J.,Heinfeld S., and Weissman I.L. Purification and characterization of mouse hemopoietin stem cells Science 1998. 241:58-62

Starr R., Wilson T.A., Viney E.M., Murray L.J., Rayner J.R., Jenkins J.B., Gonda T.J., Alexander W.S., Metcalf D., Nicola N.A., and Hilton D.J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling nature .387; 917-921

Steinbrook Robert, (2007) Erythropoietin, the FDA and Oncology. N.Engl.J. MED 356,24 june 14.

Takahiko Hara, Koh Nakayama and Atsushi Mijayima. Hematopoietic signal transduction. Hematopoiesis. A developmental approach. Edited by Leonard I Zon. Oxford University pres.2000

Tsunemichi Shirota and M. Tavasoli CPA induced alterations of bone marrow endothelium: implications in homing of marrow cells after transplantation Experimental Hematol 19:369-373 (1991)

Testa U, (2004) Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. (Review) Leukemia 18: 1176-1199

Udupa, K.B., Sharma, B.G., (1996). Possible rol of tumor necrosis factor-alpha in erythropoietic suppression by endotoxin and granulocyte/macrophage colony stimulating factor. Am. J. Hematol. 52, 178-183.

Vaux D.L; Stasser, A (1996); The molecular biology of apoptosis Proc. Natl Acad; Sci USA Vol 93 pp 2239-2244; March 1996

Wang GL, Semenza GL. (1996). Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expresión. Curr. Op. Hematol. 3: 156-166.

Watovich y col., Cell and Development Biol. 1996, 12:91-128, Annual Reviews, Biomedical Sciences.

Wen, D., Boissel, J. P., Tracy, T. E., Grunningen, R.H., Mulcahy, L.S, Czelusniak,J.,

Zanjani E, Ascensao J, Tavassoli M.(1993). Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. Blood 81: 399-404.

Zeuner A, Peolini F, Signore M, Testa U, Pelosi EO, Peschle C, De Maria R. Stem cell factor protects erythroid precursor cells from chemotherapeutic agents via up-regulation of Bcl – 2 family proteins. Blood 2003; 102: 87- 93.

Zhang L, Yu L, Park BH, Kingler KW, Volgestein B. Role of Bax in teh apoptotic response to anticancer agents. Science 2000; 290: 989-92

