



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Programa Institucional de Biomedicina Molecular

“Caracterización de Distroglicanos en Progenitores Hematopoyéticos de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica”

Tesis para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

M.C. Teniente De Alba María del Carmen

Director de tesis:

Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado

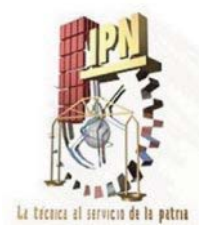


México , D.F.

Diciembre 2010



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA



SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Programa Institucional de Biomedicina Molecular

“Caracterización de Distroglicanos en Progenitores Hematopoyéticos de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica”.

Tesis para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

M.C. Teniente De Alba María del Carmen.

Director de tesis:

Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado.

México D.F.

2010

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Programa de Institucional de Biomedicina Molecular

Comité Tutorial

✧ **Dr. Bulmaro Cisneros Vega**

✧ **Dra. Irene Mendoza Lujambio**

✧ **Dr. Cesar Augusto Reyes López**

✧ **Dr. Juan Santiago Salas Benito**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 15 del mes de Noviembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía para examinar la tesis titulada:

"Caracterización de Distroglucanos en Progenitores Hematopoyéticos de Pacientes con Leucemia Mieloide Crónica"

Presentada por el alumno:

Teniente De Alba María del Carmen
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	9	7	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Dra. Doris A. Cerecedo Mercado

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Dr. César A. Sandino Reyes López

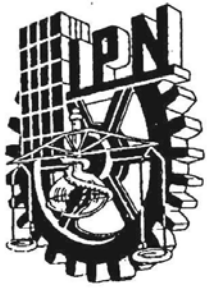
Dra. Irene Mendoza Lujambio



Santiago Salas Benito

Dr. César A. Sandino Reyes Martínez

SECRETARÍA DE EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D.F. el día 16 del mes Noviembre del año 2010, el (la) que suscribe Teniente De Alba María del Carmen alumno (a) del Programa de Maestría en Biomedicina Molecular, con número de registro B 08 1972, adscrito a la: Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Doris Atenea Cerecedo Mercado y cede los derechos del trabajo intitulado Caracterización de Distroglicanos en progenitores hematopoyéticos de pacientes con Leucemia mieloide Crónica, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: cartena_81@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María del Carmen Teniente De Alba

Esta tesis de maestría en ciencias con orientación en biomedicina molecular se realizó en el Laboratorio de Hematobiología Molecular de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional

Bajo la dirección de la Dra. Doris A. Cerecedo Mercado

Así mismo el desarrollo de ésta tesis se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT en el período agosto del 2009 a diciembre del 2010.

De igual manera esta tesis contó con el valioso respaldo del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional; durante el período agosto del 2009 a diciembre del 2010.

*... "La perseverancia es convertir
todo aquello imposible en posible"...*

A quienes me dieron grandes lecciones de vida:

Luisa Fernanda:

No solo mi prima, mi hermana, mi mejor amiga

Compañera de juegos y vivencias.

Porque me enseñó a disfrutar al máximo lo que te da la vida.

4

Carlos Daniel:

Mi primer paciente con leucemia:

Quien se convirtió en un gran amigo y un ejemplo de lucha.

En donde quiera que se encuentren.

Agradecimientos:

A mi familia; mi mayor tesoro:

Lila, Pooh y Piqui. Porque estuvieron siempre conmigo, me apoyaron en todo momento; incluso cuando las cosas salieron mal. Que jamás dejaron de animarme para realizar mis inquietudes. Porque siempre estuvieron allí, cuando me atacó la impaciencia; cuando ya no podía con más... porque que jamás dejaron de creer en que "podía".

A la Dra. Doris:

Que me acompañó en esta travesía, me enseñó y me dio mis jalones oportunos de orejas, compartió conmigo un poco de la maravilla que son las DAP's. Y creyó en mí como alumna.

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN), Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (ENMyH) y al Posgrado de Biomedicina Molecular (PIBIOM); por darme la oportunidad de Continuar con mi educación y crecimiento profesional.

Al M en C Iván J. Galván:

Por su infinita paciencia, su ayuda y sus consejos e historias. Por escuchar mis múltiples traumas, por demostrarme que todo es perfecto y que no hay que rendirse por muy difícil que esté el tiempo.

Al Dr. Bulmaro Cisneros:

Que me recibió como una alumna más y dejó las puertas abiertas de su laboratorio para poder trabajar y presentarme siempre que lo necesitara.

A los chicos del L-12 de Genética CINVESTAV, quienes me ayudaron y adoptaron como su compañera. Especialmente a Ivette, quién me ayudo cuando las cosas no salían nada bien y me asesoró durante la realización de la metodología; a Pablo y Ale: que también compartieron conmigo sus conocimientos y me ayudaron a entender las técnicas.

Al Hospital Regional 1º de Octubre ISSSTE: que un día me vio como médico interno y contribuyó en mi formación y ahora nuevamente abrió sus puertas para la realización de éste proyecto de

investigación.

Al comité de ética e investigación que se tomó el tiempo para considerar el proyecto.

A la Dra Ma. Luisa Osnaya y al Dr. Vicente Rosas:

Que son dos médicos con una gran calidad humana que se comprometieron con el proyecto y me brindaron su apoyo para llevar a buen fin mi tesis de maestría.

Al Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS):

Que me brindó la oportunidad de tener una colaboración, especialmente a la sección de investigación que cuenta con excelentes profesionales: a los QFB. Anita, Salvador, Angélica, Sandra, Cristina, Miriam, Silvia Tovar y al Dr. Montaña.

A mi comité tutorial:

Dr. César, Dra. Irene y Dr. Juan. Que con su experiencia, sus consejos y observaciones me orientaron y me dieron una mejor visión de las cosas aprendidas.

A mis compañeros y amigos del posgrado: Martha, Bere, Nelson, Edith, Roberto, Rox, César y Jonathan: por la grata compañía, las porras y la convivencia.

Al M. en C. Victor Hugo Rosales: Porque con sus ocurrencias hizo más agradable el trabajo.

A todas aquellas personas que caminaron esta etapa conmigo, que durante este tiempo influyeron en mi persona de un modo u otro y me obligaron a crecer un poco más.

A Dios:

Que siempre me ha colocado en el lugar correcto, en el momento y tiempo oportuno.

Porque todo es perfecto...

INDICE GENERAL

RESUMEN	13
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	17
1. Aspectos generales de las células tallo embrionarias (<i>stem cells</i>).....	17
2. Ontogenia de la médula ósea.....	18
2.1. Papel de los nichos celulares durante la hematopoyesis.....	20
3. Patologías de la médula ósea.....	22
4. Leucemia Mieloide Crónica.....	23
5. Etiopatogenia LMC.....	27
6. Matriz Extracelular y Complejo de proteínas asociadas a Distrofina.....	30
6.1 Proteínas asociadas al complejo de distrofina.....	32
6.2 El Distroglicano, un integrante del DAPC.....	33
6.2.1 α -distroglicano (α -Dg).....	34
6.2.2 β -distroglicano (β -Dg).....	35
6.2.3 α y β Dg.....	35
7. Distroglicanopatías y otras patologías relacionadas.....	36

ANTECEDENTES DEL PROYECTO	37
JUSTIFICACION	38
HIPOTESIS	39
OBJETIVOS	40
Generales.....	40
Específicos.....	40
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	41
METODOLOGIA	42
Diseño del estudio.....	42
Población y tamaño de la muestra.....	42
• Criterios de inclusión.....	42
• Criterios de exclusión.....	43
• Grupo problema.....	43
• Grupo control.....	44
• Criterios de eliminación.....	44
MATERIALES	45
Materiales para purificación de células tallo hematopoyéticas humanas.....	45
Materiales para inmunofluorescencia.....	45

Materiales para Western-blot	46
Materiales para Inmunoprecipitación	47
Materiales para Citometría de Flujo	48
MÉTODOS	49
1. Método para aislar Células Sanguíneas.....	49
1.2 Aislamiento de CD34 ⁺ en LMC o SCU.....	50
1.3 Aislamiento de células CD34 ⁺ por Perlas Magnéticas.....	50
1.4 Cuantificación de células CD34 ⁺ en citómetro de flujo FACScalibur.....	50
2. Evaluación de Distroglicanos y la posible formación de complejos con proteínas asociadas.....	51
2.1. Análisis por Western blot.....	52
2.2. Ensayo de Inmunoprecipitación.....	53
2.3. Técnica de Inmunofluorescencia.....	53
RESULTADOS	55
1. La forma corta Dp71 está presente en células tallo hematopoyéticas (CD34 ⁺) humanas y co-localiza con filamentos de actina	55
2. Utrofina esta presente en células tallo de sangre de cordón umbilical y co-	

localiza con filamentos de actina.....	59
3. El β -dístroglicano esta presente en células tallo humanas de sangre de cordón umbilical.....	61
4. α -dístroglicano esta presente en células tallo humanas de sangre de cordón umbilical	63
5. α -sintrofina está presente en células CD34 ⁺ humanas.....	66
6. α -Distrobrevina esta presente en Células tallo humanas de SCU.....	68
7. Dp co-localiza con β -Dg, α -Db y α -sintrofina respectivamente en Células tallo humanas de SCU.....	70
8. Up400/Up140 co-localiza con β -Dg, α -Db y α -sintrofina en CD34 ⁺ de SCU...73	
9. Comparación de la distribución topográfica de Dp en CD34 ⁺ humanas de SCU y LMC.....	75
10. Análisis de Utrofina en células tallo de sangre de cordón umbilical y células de médula ósea de pacientes con LMC.....	76
11. Comparación y análisis de α -dístroglicano en células de SCU y Células Leucémicas.....	76
12. Comparación de β -Dg células tallo humanas de SCU y LMC.....	77
13. Identificación y comparación de α -sintrofina en células tallo humanas de	

sangre de cordón umbilical y de LMC.....	77
14. α -Db se observa en baja concentración en CD34 ⁺ de SCU.....	78
15. Interacción de Distrofina y su proteína homóloga Utrofina con el DAPC en LMC.....	82
16. Cultivo primario de células CD34 ⁺	87
DISCUSIÓN.....	91
CONCLUSIONES.....	94
PERSPECTIVAS.....	95
BIBLIOGRAFÍA.....	96

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Los tipos de células madre.....	17
Figura 1. 1: Modelo jerárquico de las células madre.....	19
Figura 2: Esquema representativo de médula ósea; la conformación del nicho celular y sus funciones.....	21
Figura 3: Esquema de la translocación recíproca (9; 22), causante de LMC.....	30
Figura 4: Modelo del DAPC, modificado por Cohn y Campbell en 2000.....	33
Figura 5: Caracterización de la proteína Distrofina (Dp).....	58
Figura 6: Caracterización de la proteína Utrofina (Up).....	60
Figura 7: Caracterización de β -Dg en C2C12 y CD34 ⁺	62
Figura 8: Caracterización de α -Dg; proteína perteneciente al DAPC.....	65
Figura 9: Caracterización de α -sintrofina en células C2C12 y CD34 ⁺	67
Figura 10: Caracterización de α -Db proteína perteneciente al DAPC.....	69
Figura 11: Se confirma la interacción de Dp con el DAPC.....	72
Figura12: Interacción de Up con las DAPC.....	74
Figura 13: Comparación de la Distribución topográfica en CD34 ⁺ de SCU y CD34 ⁺ de LMC.....	79, 80, 81

Figura 14: Relación que mantiene Distrofina con el DAPC en células leucémicas.....	83
Figura 15: Relación que mantiene Utrofina con el DAPC en LMC.....	84
Figura 16: Control interno de Células CD34 ⁺ de SCU.....	86
Figura 17: Ensayos de Inmunoprecipitación para comprobar la interacción de Actina con Dp, Up y el DAPC.....	87
Figura 18: Identificación de la distribución topográfica con Actina filamentosa con Dp, Up y el DAPC, en cultivo de células CD34 ⁺	88
Figura 19: Interacción de Distrofina con el DAPC en cultivo de CD34 ⁺	89
Figura 20: Interacción de Up con el DAPC en cultivo celular de CD34 ⁺	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Materiales para separación de CD34+.....	45
Tabla 2: Materiales utilizados para Inmunofluorescencia.....	45
Tabla 2.1: Anticuerpos secundarios utilizados en Inmunofluorescencia.....	45
Tabla 3: Materiales utilizados para Western blot.....	46
Tabla 4: Materiales para inmunoprecipitación.....	46
Tabla 5: Anticuerpos primarios para Inmunofluorescencia.....	47
Tabla 6: Anticuerpos para citometría de flujo.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

A

ABL

Cromosoma Abelson.

ARP2/3

Actin related protein (proteínas relacionadas a actina)

B

BSA

Albumina de suero bovino fetal

C

CD

Cluster of differentiation antigen (marcador celular)

CD34+

Marcador celular de células tallo maduras hematopoyéticas

CCyR

Remisión citogénica completa

CHR

Respuesta hematológica completa

CNTS

Centro Nacional de la Transfusión sanguínea

C-terminal

Carboxilo terminal

D

DAG

Gen que codifica para Distroglicano

DAP	Proteínas asociadas a Distrofina
DAPC	Complejo de Proteínas asociadas a Distrofina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
Db	Distrobrevina
Dg	Distroglicano
Dp	Dystrophin protein (proteína distrofina)
DRP2	Dystrophin related protein 2(proteína similar a la distrofina 2)
F	
F-actina	Actina filamentosa
FAK	Cinasa de Adhesión Focal
FITC	Isotiocianato de fluoresceina conjugado
H	
HRP	Horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano)
HSC	Hematopoyetic stem cell.
HSCs	Células Troncales hematopoyéticas

IIFN α

Interferón alfa

ISSSTE

Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

K

Kb

Kilobase

K Da

Kilodalton

L

LLA

Leucemia Linfoide Aguda

LMA

Leucemia Mieloide Aguda

LMC

Leucemia Mieloide Crónica

M

MEC

Matríz Extracelular

MO

Médula Ósea

MSC

Células troncales Mesenquimales

N

N-terminal

Amino terminal

P

PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PE	Ficoeritrin (ficoeritrina)
Ph	Cromosoma Filadelfia
PMN	Polimorfonucleares
Q	
qRT- PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
R	
rpm	Revoluciones por minuto
S	
SCU	Sangre de Cordón Umbilical
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
T	
TKI	Inhibidores de la tirosina cinasa
TRICT	Isotiocianato de rodamina
U	
Up	Utrophyn protein (proteína utrofina)

Caracterización de Distroglicanos en Progenitores Hematopoyéticos de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica

Resumen

La médula ósea roja tiene la función hematopoyética y alberga a las células CD34⁺; las cuales conservan las propiedades: de auto-renovación y diferenciación hematopoyética. La hematopoyesis se produce en nichos que permiten el mantenimiento, crecimiento y diferenciación de las células madre y juegan un papel primordial en la adecuada función y la supervivencia del organismo. La leucemia mieloide crónica (LMC), es una neoplasia, clonal, caracterizada por sobreproducción incontrolada de células granulocíticas; debido a una translocación genética en el cromosoma Filadelfia (Ph). La acción de la proteína tirosina cinasa aberrante, producto de la translocación 9;22, favorece la supervivencia celular, la proliferación e inhibe la apoptosis por medio de la utilización las vías de señalización, siendo responsable del desarrollo de la enfermedad y el proceso de malignización. La alteración de la adhesión celular en la LMC juega un papel crucial en el comportamiento celular y la progresión de la enfermedad. Sin embargo, los posibles efectores de las deficiencias en la adhesión de las células CD34⁺ de LMC aún no han sido identificados pero se ha demostrado que existen cambios estructurales en la célula, que afectan al citoesqueleto y membrana celular. Recientemente se ha comprobado que la alteración de alfa y beta distroglicano componentes del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) o la ausencia de estas han sido asociadas a la presencia de trastornos neoplásicos.

En el presente estudio se caracterizó la presencia del patrón de expresión de distrofinas, utrofinas y proteínas asociadas con especial atención a alfa y beta

distroglicano en células tallo hematopoyéticas CD34⁺ de SCU. Estas células fueron comparadas con los patrones de expresión de las células CD34⁺ de individuos con LMC en las cuales se observó una aparente disminución de las proteínas que constituyen los complejos de distrofina y utrofina así como una redistribución intranuclear. Los resultados podrían sugerir que los complejos asociados a distrofina podrían participar como un componente de la matriz nuclear regulando la expresión génica y por tanto de la patología.

Así mismo, se sugiere que las diferencias en la distribución de los componentes de los complejos proteicos asociados en las células CD34⁺ de pacientes con leucemia mieloide crónica podrían estar relacionados con la patología de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: *Leucemia Mieloide Crónica, tirosina cinasa, BCR-ABL, Distroglicanos, Distrofina, Cromosoma Filadelfia.*

Characterization of dystroglycans in Hematopoietic Progenitors patients with chronic myeloid leukemia

Abstract

Red bone marrow function is to home and shelter to the CD34+ cells, which retain the properties of self-renewal and hematopoietic differentiation. Hematopoiesis occurs in niches that allow the maintenance, growth and differentiation of stem cells and play a role in the proper function and survival of the organism. Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal disease characterized by uncontrolled overproduction of granulocytic cells, due to a genetic translocation in the Philadelphia chromosome (Ph). The action of the aberrant protein tyrosine kinase, product of the translocation 9:22 favors cell survival, proliferation and inhibits apoptosis through the use of signaling pathways, responsible for disease development and worsening process.

The alteration in CML cell adhesion plays a crucial role in cell behavior and disease progression. However, the possible effectors of the deficiencies in the adhesion of CML CD34 cells have not yet been identified but have been shown that there are structural changes in the cell, affecting the cytoskeleton and cell membrane. It has recently been shown that alteration or absence of alpha and beta dystroglycan, components of dystrophin-associated proteins complex (DAPC) have been associated with the presence of neoplastic disorders.

In this study we characterized the pattern expression of dystrophin, utrophin and associated proteins with emphasis on alpha and beta dystroglycan in hematopoietic stem cells from cord blood CD34. These cells were compared with

patterns of expression of CD34 cells from individuals with CML in which there was an apparent decrease in the proteins that constitute the complex of dystrophin and utrophin and an intranuclear redistribution. The results may suggest that the dystrophin associated complex could participate as a component of the nuclear matrix regulating gene expression and therefore pathology. Also, they suggest that differences in the distribution of the components of protein complexes associated with CD34 in patients with chronic myeloid leukemia cells may be related to the pathology of their illness.

KEY WORDS: Chronic myeloid leukemia (LMC), tyrosin kinase, BCR-ABL, dystroglycan, dystrophin, Philadelphia chromosome.

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales de las células tallo embrionarias (*stem cells*)

Una célula troncal embrionaria o totipotencial, es una estirpe celular indiferenciada capaz de dividirse indefinidamente y dar origen a los diversos tipos de células especializadas; ya que conservan la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y por consiguiente generar células maduras tanto morfológica como funcionalmente. Es importante destacar que una célula troncal se denomina pluripotencial al cumplir con 2 propiedades esenciales: auto-renovación y diferenciación. Las células madre pueden clasificarse según su potencial de diferenciación. Tal es el caso de de las células madre hematopoyéticas; las cuales se clasifican como células multipotenciales adultas; pues conservan la capacidad de diferenciarse únicamente a células especializadas de tejido hematopoyético. Esta combinación de propiedades permite que una célula troncal hematopoyética sea capaz de diferenciarse en todos los tipos de células sanguíneas de forma sostenida según las necesidades del organismo durante toda la vida (4,30,38,43).

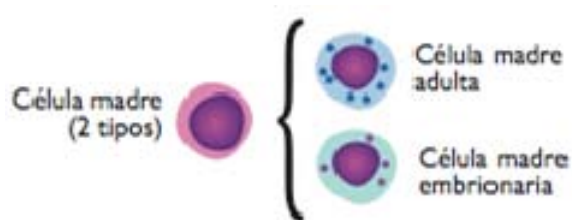


Figura 1: Una célula troncal se denomina pluripotente al cumplir con 2 propiedades esenciales: auto-renovación y diferenciación. Las células madre adultas se han caracterizado como multipotentes adultas; pues conservan únicamente la capacidad de diferenciarse en tejido especializado, tal es el caso de las células madre de tejido hematopoyético. Imagen tomada de www.crio-cord.com.

2. Ontogenia de la médula ósea

La médula ósea es un tejido que se encuentra en el interior óseo; su peso se aproxima a los 3.500 g en el adulto normal y ocupa solo el espacio medular de los huesos, principalmente en hueso esponjoso y se le ha llegado a considerar un órgano, con funciones vitales como el resto de los componentes del organismo.

Se acompaña de fibras reticulares que son componentes del estroma así como de una red de capilares sanguíneos de tipo sinusoide con epitelio continuo sin espacios intercelulares. En médula ósea están presentes las células troncales hematopoyéticas (CD34⁺), que permiten la hematopoyesis.

Para su estudio la médula ósea se clasifica en 3 tipos de tejido: Médula ósea roja que mantiene la función hematopoyética y que alberga a las CD34⁺, este tipo de tejido es abundante en la infancia y con el crecimiento se va limitando a huesos planos. Médula ósea amarilla que es la sustitución del tejido hematopoyético por tejido adiposo durante la edad madura. Médula ósea blanca tejido que sustituye médula ósea amarilla y que esta presente en edades avanzadas.

En médula, los osteoblastos y células endoteliales constituyen el mayor componente celular, son derivados de las células troncales mesenquimales (MSC) y hemangioblastos, respectivamente (1,36,37) y contribuyen a la conformación de los nichos vasculares que sirven para mantener el microambiente hematopoyético de las células tallo.

El estroma celular; no solo es un tejido inerte que forma tramas y da sostén a los diferentes tipos celulares en los tejidos, se le ha considerado su participación en la formación de nichos celulares y el desarrollo celular.

El estroma de la médula ósea (MO) se conforma por tipos celulares variados y diferentes moléculas de la matriz extracelular (MEC), cuyos componentes pueden interactuar en diferentes sitios con los progenitores hematopoyéticos, dependiendo del tipo celular y su maduración (1,18,19).

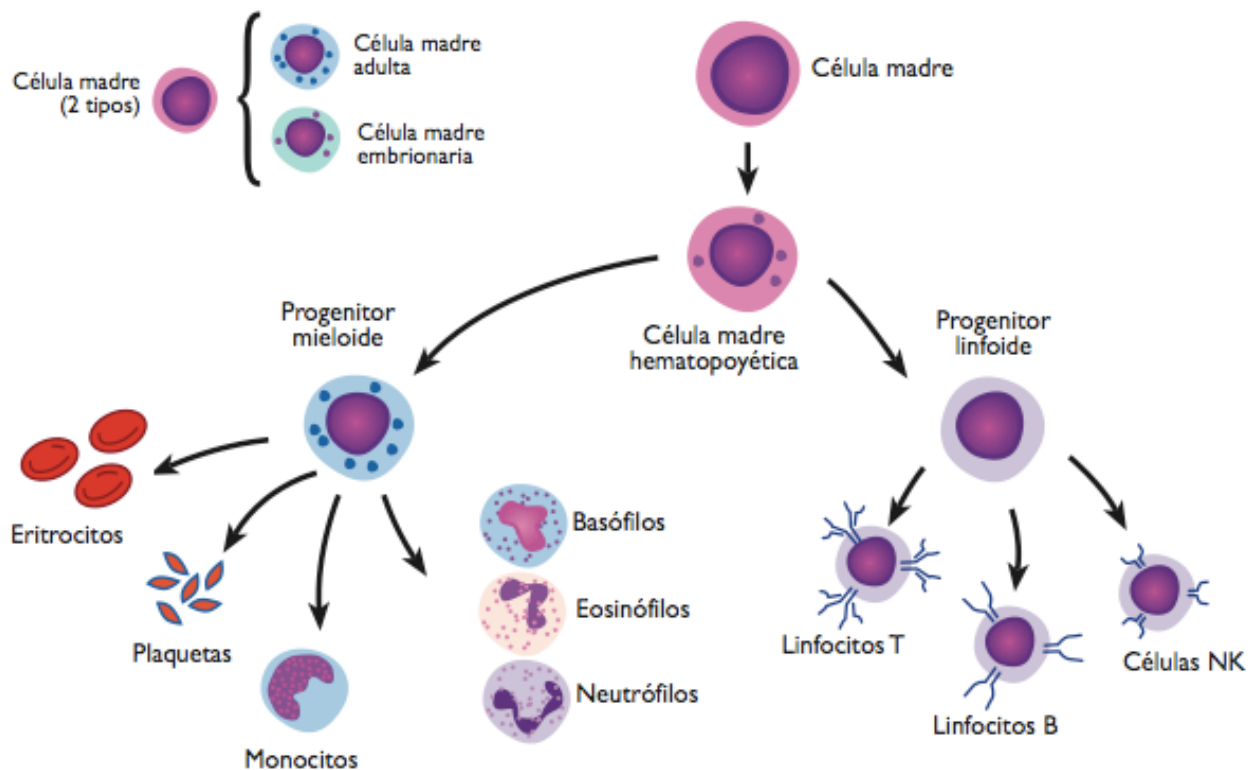


Figura 1.1: Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial de diferenciación y representación de la $CD34^+$ (célula madre hematopoyética) y las distintas estirpes celulares de tejido hematopoyético a las que da origen. Imagen tomada de Crio-Save; Europe's leading stem cell bank. www.criocord.com

2.1. Papel de los nichos celulares durante la hematopoyesis

En la vida post-fetal, la hematopoyesis se produce exclusivamente en microambientes o «nichos» en médula ósea.

Estos nichos facilitan el mantenimiento de las células troncal hematopoyéticas (HSCs) como unipotentes, con el compromiso de apoyar la expansión del linaje de poblaciones sanguíneas.

La localización física, que regula la función de HSC, en el nicho es de vital importancia para la función y la supervivencia del organismo.

Esto pone bastante presión selectiva sobre HSCs, ya que sólo aquellas células que son capaces de desarrollarse y de realizar sus funciones dentro del nicho con los medios nutricios adecuados se mantendrán como células troncales (19, 58,59).

Con el avance en las técnicas de biología molecular, ahora se tiene mayor comprensión de los procesos que operan en los nichos a nivel molecular; incluyendo la adhesión a la matriz extracelular, interacción célula-célula y su retroalimentación positiva y negativa así como la función del macrófago central en el desarrollo de las diferentes estirpes celulares (10, 15, 18,26, 37).

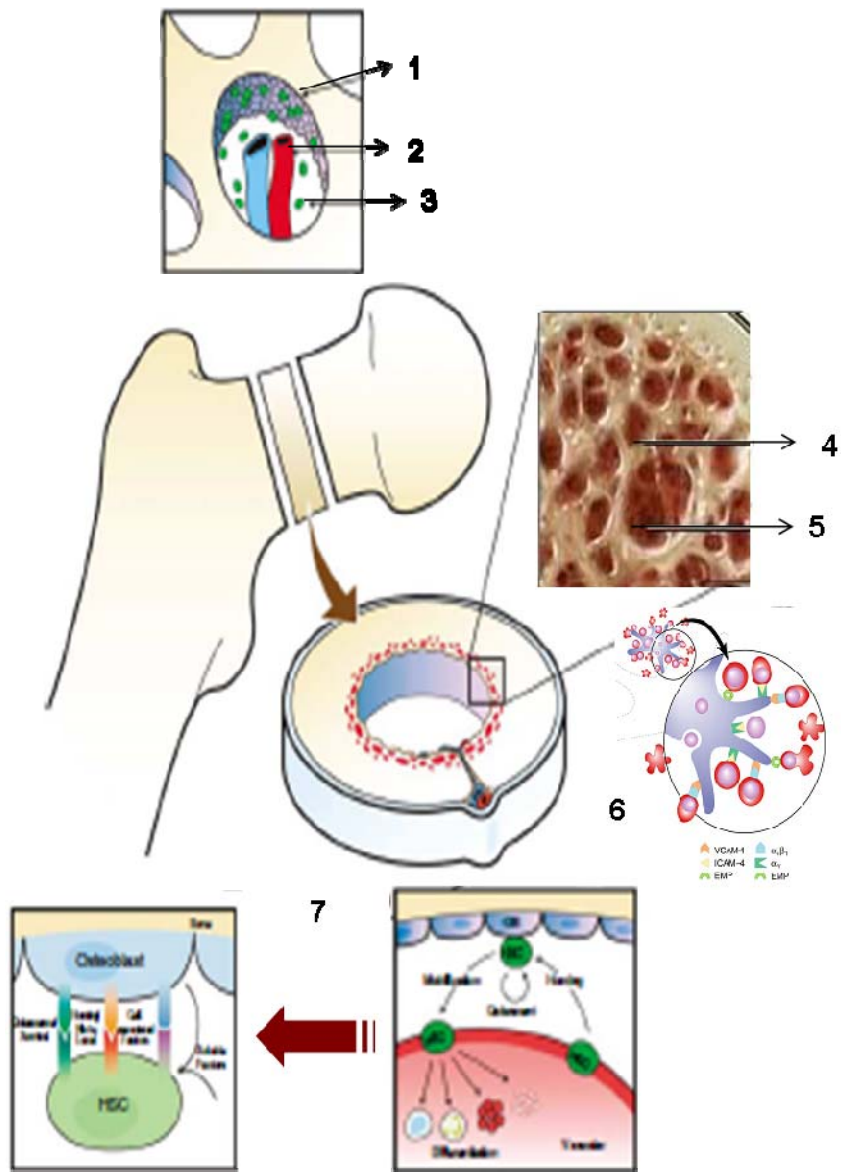


Figura 2: Esquema representativo de médula ósea; la conformación del nicho celular y sus funciones: de arriba hacia abajo podemos observar en el primer recuadro un corte de hueso largo que representa: El nicho endotelial (1), Nicho vascular (2) y MEC (3). En el segundo recuadro es posible observar una ampliación del corte que representa a MO (5) y su distribución en hueso esponjoso (4). En el tercer recuadro se representa el nicho celular donde se lleva a cabo la conservación y diferenciación de las $CD34^+$, además de la importancia

de la asociación del estroma con la laminina para conservación del mismo (6). Por último en el cuarto y quinto recuadro es posible observar la función del nicho celular, la importancia de la adhesión a la MEC y la participación e el mantenimiento del equilibrio de MO, de citocinas, interleucinas, fibroblastos, macrófagos, adipocitos y células mesenquimatosas (7). Esquema original tomado de www.nature.com

3. Patologías de la médula ósea (MO)

En MO, también se cumplen funciones de hemólisis fisiológica e inmunidad. La linfopoyesis se origina también aquí y por tanto no es extraño que se afecte directamente en numerosos procesos de tipo sistémico; como ocurre en algunas enfermedades infecciosas, de tipo metabólico, así como de forma indirecta en la anemia o en casos específicos como el cáncer.

Se conocen como hemopatías a todos aquellos trastornos propios de las células que se generan en MO a partir de las células madre hematopoyéticas. A estos padecimientos se les conocen como *trastornos de la serie roja, (eritrocitos); o de la serie blanca, (que corresponden a dos grandes familias de leucocitos: células de estirpe monocito-granulocítica y linfocitos).*

Según el tipo celular que se afecte, serán generados padecimientos tales como: Síndromes anémicos; Dis-eritropoyesis Congénitas, Síndromes Linfoproliferativos, Aplasia medular. Linfomas Hodgking; no Hodgking. Leucemias linfocíticas o granulocíticas, agudas y crónicas. En los casos con una destrucción celular acelerada, la médula se torna hiper celular y muestra abundantes células mieloides inmaduras.

Las leucemias son proliferaciones neoplásicas de las células hematopoyéticas en las que se produce una sustitución del tejido medular por la neoplasia, con la

pérdida consiguiente de las células normales, aparición de células tumorales en la sangre y fenómenos de infiltración de ciertos órganos como el hígado, bazo, ganglios linfáticos o cualquier otro órgano.

Las leucemias pueden originarse en cualquier serie hematopoyética. Las más frecuentes son las leucemias de la serie granulocítica y linfoide. En ambos casos, el cuadro proliferativo puede estar compuesto por células de aspecto maduro coincidiendo con un cuadro clínico crónico (Leucemias Crónicas).

4. Leucemia Mieloide Crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC), es una neoplasia, procedente de la línea mieloide, de naturaleza clonal, clasificada dentro de los síndromes mieloproliferativos crónicos. Este padecimiento se caracteriza por una sobreproducción incontrolada de células diferenciadas de la serie granulocítica y se produce por daño o funcionamiento aberrante de la célula troncal multipotencial (CD34⁺) (8,16, 21,32).

Representa el 2.8% de las formas de cáncer diagnosticadas en el mundo y del 15 al 20% de las leucemias totales, de acuerdo a la base de datos de la OMS. Por lo que se estima que existen 1.6 casos por 100,000 habitantes. Prevalece en varones **1.3:1** con respecto a las mujeres y la incidencia es alrededor de los 40 a 60 años, aunque esto no significa que tanto niños como adolescentes no puedan ser afectados (32, 35, 36, 45).

Dentro de la población adulta mexicana; la LMC es uno de los tipos más frecuentes de leucemia, con una prevalencia de 6 mil pacientes y una incidencia de mil nuevos casos cada año.

Se trata de la segunda causa más frecuente de cáncer en el país y representa el 55% de las muertes relacionadas con enfermedades hemato-oncológicas, ya que nueve de cada diez casos no saben que padecen la enfermedad y por lo tanto se diagnostican cuando ésta se encuentra muy avanzada y aunque es controlable, el 30% de los pacientes es resistente a los tratamientos existentes según los reportes del Instituto Nacional de Cancerología (16, 18, 36, 50).

Al momento de hacer el diagnóstico de LMC este puede ser fortuito durante un chequeo de rutina, debido a la inicial sobre producción de granulocitos diferenciados. Por lo que más de la mitad de los afectados son asintomáticos; sin embargo la afectación es progresiva y la sobrevida oscila en un promedio de 4 y 6 años después de haberse hecho el diagnóstico, (aunque puede variar a más o menos años); aun con tratamiento adecuado para el paciente. Independientemente de los hallazgos en los exámenes de laboratorio y de la semiología clínica dada por las características del progreso de la enfermedad; el diagnóstico definitivo, esta sustentado por un examen de citogenética y PCR.

La importancia de esta prueba radica en que el análisis molecular de las anomalías citogenéticas ha identificado los genes responsables de la transformación neoplásica; los oncogenes y los genes supresores tumorales. Además de su localización, en muchos casos también conocemos su función, y hay evidencia de su participación en la transformación celular neoplásica.

Los signos y síntomas clínicos que presenta el paciente durante la evolución de la enfermedad; lo llevan finalmente en un alto porcentaje de los casos a estadios avanzados en los que la patología finalmente entra a una fase aguda; que desemboca en lo que se conoce como etapa blástica o acelerada en la cual la conservación del cromosoma Filadelfia y en algunos casos la pobre respuesta al

tratamiento pueden condicionar frecuentemente la aparición de otros trastornos cromosómicos que deriven en leucemia mieloide aguda (LMA) o leucemia linfocítica aguda (LLA), entre otros.

La LMC se presenta en fase crónica y una vez hecho el diagnóstico, e independientemente del tratamiento; la enfermedad sigue su curso natural. La etapa avanzada incluye un período de aceleración clínica denominada fase acelerada que desemboca en una crisis blástica, que consiste en un período de sobreproducción intensa de células blásticas leucémicas resistentes a terapia. Antes de la introducción al mercado farmacéutico de los inhibidores de la tirosinasa (TKI); el tratamiento era conservador y consistía en terapia citotóxica, (aplicación de ciclos de quimioterapia) o inmunológica en algunos casos; con trasplante de médula ósea y/o interferón alfa (IFN α). Sin embargo, al ser desarrollados los TKIs en base al conocimiento de la estructura molecular de la tirosinasa BCR-ABL y los mecanismos de la enfermedad, se han obtenido para el paciente mejores opciones terapéuticas con medicamento y menores efectos adversos (3, 21, 53,61).

El mesilato de imatinib fue la primera TKI con alta efectividad utilizada en el tratamiento de LMC y ha modificado relativamente la historia natural de la enfermedad. Adicionalmente, los efectos colaterales debidos a la terapia con TKIs son mínimos en células normales debido a la especificidad relativa con la que trabaja el medicamento sobre las células leucémicas.

No obstante, la terapia no es curativa, pues actúa suprimiendo a las clonas malignas pero no elimina la causa de la enfermedad. Al parecer la célula tallo

primitiva portadora del cromosoma Ph1 para LMC, es refractaria a la terapia con TKI, proporcionando posibles mutaciones posteriores del gen BCR-ABL y en ausencia de TKIs, la mutación es transmitida sin problema a su progenie.

Con respecto a los resultados durante el tratamiento, éstos se miden por el grado de respuesta hematológica, citogenética y molecular alcanzada. La respuesta hematológica completa (CHR) es definida por la normalización de las cuentas leucocitarias, la remisión citogenética completa (CCyR) por la ausencia del cromosoma Filadelfia en 20 metafases en un análisis clásico del cariotipo, y una respuesta molecular completa (CMR) significa una eliminación de los transcritos de RNA de BCR-ABL detectados por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR).

La resistencia al mesilato de imatinib es frecuente debido a la presencia de mutaciones en la región codificante del dominio de la cinasa BCR-ABL (34,36, 44); por lo cual se han desarrollado nuevas generaciones de TKIs dirigidas a la resistencia e intolerancia del mesilato de imatinib, casi todos los pacientes con LMC pueden alcanzar una CHR y más del 90% alcanza CCyR con terapia y seguimiento de más de 2 años.

Desafortunadamente, los índices de respuesta en los estadios avanzados de la enfermedad son pobres; no obstante la mayoría de los pacientes pueden vivir libres de la enfermedad con terapia TKI siempre que el tratamiento no sea interrumpido (3, 6, 8,16, 17).

La respuesta molecular completa ocurre en solo el 4% de los pacientes que recibieron dosis estándar del mesilato de imatinib (27, 29). Estos pacientes aún conservan células malignas que generalmente no son detectables con los métodos normalmente utilizados en la clínica, (q-RT PCR); lo cual sugiere que las células que logran sobrevivir son refractarias al tratamiento pero no resistentes.

Esto hace necesario, conocer un poco más de los componentes moleculares y genéticos de la fisiopatología de LMC, pues en muchas de las ocasiones proveen de un campo amplio para la comprensión detallada y mejor tratamiento de la enfermedad. Las técnicas de biología molecular, han puesto en evidencia la existencia del gen específico así como anomalías cromosómicas y aspectos moleculares comprometidos en el desarrollo de leucemia mieloide crónica (LMC) y que a su vez pueden estar presentes en la mayoría de las leucemias.

5. Etiopatogenia de la LMC

Los trastornos de las células troncal hematopoyéticas (HSC) y la leucemia mieloide crónica (LMC); son la primer patología clonal descrita que presenta una mutación genética dominante adquirida (18, 21, 35). Durante la investigación de estos padecimientos, se detectó por primera vez la alteración cromosómica del gen ABL-BCR presente en el 95% de los casos, dicha alteración se conoce también como cromosoma Filadelfia (Ph), el cual es producto de la translocación recíproca (9; 22) en los brazos largos de dicho cromosoma (34q, 11q). El gen cinasa Abelson (ABL), también conocido como ABL1 perteneciente al cromosoma 9 en su región de entrecruzamiento (breakpoint cluster), presenta una interrupción y unión a la región (BCR) gen del cromosoma 22, lo cual da origen a un cromosoma híbrido de mal funcionamiento. El producto resultante de la proteína ABL –BCR es una tirosina cinasa aberrante constitutivamente activa; favorece la supervivencia y la proliferación celular e inhibe la apoptosis, siendo responsable del desarrollo de la enfermedad y el proceso de malignización.

La translocación t(9;22)(q34;q11), que alberga al cromosoma Ph1, es también una alteración citogenética frecuente de la LLA en adultos y se detecta en el 25-50% de los casos y en el 5% de los casos pediátricos (mayores de 10 años), con leucemias pre-B (inmunoglobulina citoplásmica negativa) con hiper-leucocitosis. A nivel citogenético, la t(9;22) en la LLA y en la leucemia mieloide crónica (LMC) parece idéntica, pero con técnicas moleculares el punto de ruptura en el gen BCR en el cromosoma 22 es más proximal en la LLA Ph1 que en la LMC. El gen BCR-ABL en la LLA es por lo tanto más pequeño, codificando una proteína p190 bcr/abl menor que la p210 bcr/abl característica de la LMC (29, 42, 34). En dos estudios de Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) en adultos, la incidencia de LLA-Ph fue del 14-22% con citogenética, aumentando al 23-45% con PCR. Desde el punto de vista terapéutico, es importante la diferenciación LMC en fase de crisis blástica linfocítica y LLA-Ph1 por ejemplo, lo cual es posible por medio del estudio citogenético y molecular.

P210 BCR-ABL se encuentra principalmente en el citoplasma, asociado de manera cercana con F-actina por medio de la vinculación con su dominio C-terminal, fosforilando varias proteínas del complejo de adhesión. La modificación de los vínculos entre las células cancerosas y matriz extracelular y a su vez las interacciones entre p210 BCR-ABL y el citoesqueleto en la célula puede ser importante para las funciones celulares. No obstante que los posibles efectores de las deficiencias en la adhesión de las células CD34+ de LMC aún no han sido identificadas (36); se ha demostrado que los progenitores Ph positivos son incapaces de adherirse a la MEC.

Solo el 20% o 30% de células de LMC tiene capacidad de unirse a laminina y colágena tipo IV facilitando su salida de la MO a la circulación sanguínea; mientras que la presencia y funcionalidad de receptores asociados con fibronectina y

laminina es aún controversial (6, 8, 50). Así mismo, se han reportado cambios en la expresión de la integrina β -1 así como de la cinasa de adhesión focal (FAK); los cuales son restaurados por la administración de interferón- α . El IFN- α ha sido empleado por más de dos décadas con eficiencia variable, tiene poco efecto sobre el volumen tumoral pero puede inducir a las células de la LMC a diferenciación *in vitro* (55, 16, 18, 21); regulando su actividad oncogén. Además de las principales mutaciones genéticas, las anormalidades citogenéticas, también constituyen acontecimientos clave en la patogénesis de la LMC. Se han agrupado para su estudio alteraciones en tres grupos: (1) las mutaciones que afectan a los genes que contribuyen a la proliferación celular (FLT3, c-KIT, RAS, proteínas tirosina fosfatasa, receptor único o ITD); (2) mutaciones que afectan genes implicados en la diferenciación mieloide (AML1 y CEBPA) y (3) mutaciones que afectan a los genes implicados en la regulación del ciclo celular o la apoptosis (p53, NPM1). Otros acontecimientos son a menudo oncogénicos como lo son las mutaciones en el receptor de FLT3-ITD que permiten una proliferación descontrolada de las clonas y una mayor supervivencia sobre las células sanas además de bloquear la diferenciación mieloide y su autorrenovación (4,29).

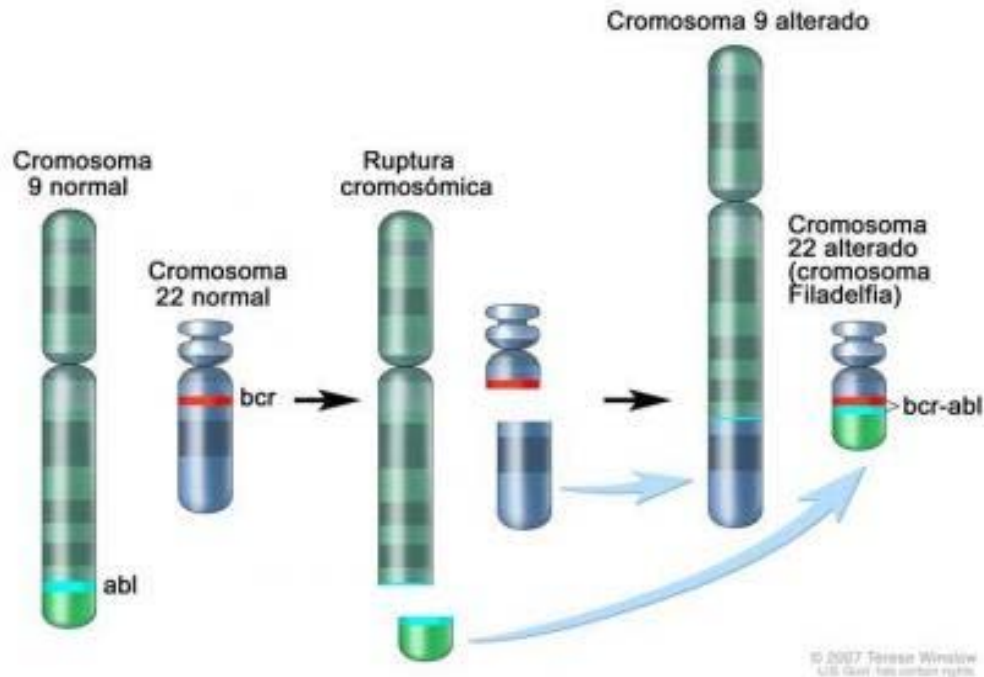


FIGURA 3: Esquema de la translocación recíproca (9; 22), causante de LMC, en los bazos largos de dichos cromosomas. La alteración cromosómica del gen ABL-BCR también conocida como cromosoma Filadelfia (Ph) se encuentra presente en el 95% de los casos de LMC. www.unidadhematooncológica.com

6.- Matriz Extracelular y Complejo de proteínas asociadas a Distrofina

La matriz extracelular (MEC) es un componente cohesivo sintetizado por las propias células, que forman un medio de integración fisiológico, de naturaleza bioquímica compleja, que implica asociaciones celulares cooperativas para formar tejidos. Su formación, se da a partir de un conjunto de macromoléculas celulares externas; que conforman el ecosistema donde la célula realiza sus funciones vitales: multiplicación, preservación, procesos bioquímicos y fisiológicos (7, 9, 20). Se pensaba que el citoesqueleto funcionaba únicamente como un armazón

proteico filamentosos desplegado por todo el citosol para dar sostén y estructura a la célula; sin embargo en años recientes se ha comenzado a considerar un componente importante dentro de la célula. Se integra por tres clases de filamentos: microtúbulos, filamentos intermedios, de actina; y un conjunto de proteínas accesorias clasificadas como reguladoras, ligadoras y motoras.

La distrofina es una proteína del citoesqueleto cuya función principal es la de conectar los filamentos de actina con la membrana celular. Su dominio N-terminal se une a la actina y su dominio C-terminal se une al complejo de proteínas asociadas a distrofina; (DAP; *Dystrophin-Associated Proteins*) en la membrana celular. DAP está conformado por un grupo de proteínas membranales, periféricas e integrales que proporcionan un vínculo estructural entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de las células (esto ha sido observado en células musculares y algunas endoteliales); las proteínas que conforman el complejo, se organizan estructuralmente en tres subcomplejos distintos:

La familia de las distrofinas y otras proteínas citoesqueléticas asociadas; distrofina/utrofina/DRP2, distrobrevinas (sub unidades α y β), sintrofinas (sub-unidades α_1 , β_1 , β_2) y los distroglicanos Dgs; sub unidades α y β) (10, 11).

En la célula la distrofina es un componente esencial que conecta el citoesqueleto de actina con la matriz extracelular a través de proteínas residentes de la membrana plasmática. Esta proteína se encuentra formando un complejo con el β -distroglicano, los sarcoglicanos, la α -distrobrevina, α , β -sintrofina y algunas otras proteínas relacionadas con la transducción de señales.

Se han realizado varios intentos para esclarecer el papel de la distrofina y la utrofina en distintos modelos celulares. En las células musculares se ha determinado tiempo atrás una asociación directa con la función (5), se ha

observado que las isoformas poseen una expresión diferencial en algunos tejidos. En plaquetas se ha demostrado que la presencia de utrofina y de isoformas cortas de distrofina, constituyen los complejos correspondientes a distrofina y utrofina promoviendo los procesos inherentes a la función plaquetaria como adhesión, agregación y centralización de los gránulos (12,13, 14).

6.1 Proteínas asociadas al complejo de distrofina (DAPC)

La distrofina y las proteínas asociadas a la distrofina (DAP's) son de vital importancia para el mantenimiento de la integridad de la membrana citoplasmática, y se ha reportado que la ausencia de la distrofina o de alguna DAP (ejemplo β -dístroglicano) generan patologías (en músculo; distrofias musculares). Recientemente se han determinado dentro de las células musculares dos isoformas nuevas de distrofina; así mismo se encontró que las DAP's que se expresan en esta línea celular son: el β -dístroglicano, la α -dístrobrevina, el α , β , γ , δ -sarcoglicano, la α , β -sintrofina y la proteína NOS; mientras que no observamos expresión de la β -dístrobrevina.

Estos resultados nos hacen pensar que la distrofina y las DAP's además de tener una función importante en la membrana citoplasmática también es probable que tengan alguna función particular según el tipo de célula y dentro del núcleo celular. Aparentemente, la función que tienen dentro del núcleo es de carácter estructural al igual que en la membrana citoplasmática, como se ha observado en estudios con la línea celular HeLa (7, 9, 20, 22, 33), en los cuales se encontró que la Dp71 y las DAP's están formando un complejo muy similar al que se encuentra en la membrana citoplasmática (8,9,14).

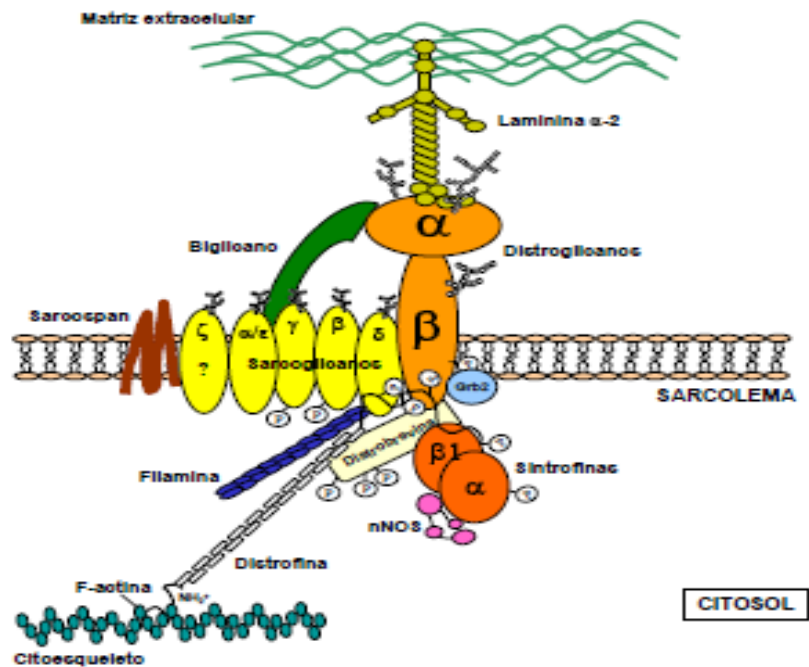


Figura 4: Modelo del DAPC, modificado por Cohn y Campbell en 2000. Esta figura muestra la localización y características del complejo dentro del citoesqueleto y en la membrana celular.

6.2 El Distroglicano, un integrante del DAPC

El distroglicano es una proteína que pertenece al DAPC. Fue nombrado Dg por su asociación a distrofina y su glucosilación extensiva; está conformado por dos subunidades α -distroglicano (α -Dg) y β -distroglicano, (β -Dg). Su función reside en organizar la unión entre laminina de ME y distrofina la cual que se enlaza a citoesqueleto, por medio de actina.

El gen *DAG-1* codifica para sintetizar el distroglicano ubicándose en la región 3p21. La secuencia codificante está dividida en dos exones, separados por un gran intrón. El transcrito derivado de 5.8 kb contiene un marco abierto de lectura

de 895 residuos y puede ser detectado en una gran variedad de tejidos encontrándose abundantemente en músculo. Se sintetiza, de un único mRNA; por procesos proteico post-traduccionales, los cuales generan una proteína única precursora; que se fragmenta por proteólisis en 2 proteínas no covalentes α y β respectivamente.

El cambio post-traducciona se genera con la ruptura en Ser654, dando como resultado a las dos proteínas maduras. El significado de esta ruptura se desconoce y la secuencia de aminoácidos alrededor del sitio de ruptura, no se encuentra conservada entre vertebrados e invertebrados. La glicobiología del distroglicano recientemente se ha detallado.

6.2.1 α -distroglicano (α -Dg)

α -Dg es una proteína extracelular que se ancla a MEC por medio de la unión a laminina- α 2; es una proteína de gran tamaño; debido a la glucosilación: tiene una masa prevista de 72 kDa; pero en geles de acrilamida migra como una banda homogénea con una masa mayor; variando de los 120 kDa en cerebro y SNP a más de 150 kDa en el músculo esquelético y cardíaco.

Estas diferencias se deben a la extensa glucosilación y a las variaciones del tejido en el que se ubica; desde hace tiempo se sabe que la glucosilación de α -Dg es necesaria para la unión a su ligando y contiene tres sitios potenciales para N-glucosilación. Mediante microscopía electrónica se ha observado a α -Dg como una molécula con forma de mancuerna, con dos dominios globulares separados por un dominio en barra que corresponde al dominio de mucina-like. Gracias a esto se sabe que α -DG cuenta con una serie de ligandos de reciente descubrimiento hacia MEC que incluyen agrina, perlecan y neurexina todos los cuales se unen a partir

de los dominios de laminina-G. De aquí surge la importancia de la glucosilación de α -Dg en las patologías (22, 28).

6.2.2 β -dístroglicano (β -Dg)

β -Dg es una glicoproteína que contiene un único dominio transmembranal. Su peso molecular se estima alrededor de los 43kDa. Al estar ubicada en membrana, intracelularmente puede unirse a distrofina o a su homóloga utrofina; mediante su extremo carboxilo terminal; que se encuentra enriquecido en prolina el cual contiene un potencial sitio de N-glicosilación.

El β -Dg se une al citoesqueleto de actina y extracelularmente al α -Dg, por lo tanto el β -Dg puede estar involucrado en las rutas de transducción de señales y en la formación de enlaces transmembrana; funcionando como un receptor celular que organiza la unión entre laminina de la matriz extracelular y citoesqueleto por medio de la distrofina y a su vez se enlaza con α -Dg que está glucosilado en la membrana e interacciona con laminina- α 2 (5, 26).

6.2.3 α - y β -dístroglicano

Las modificaciones post-traduccionales, entre las que se encuentran la glicosilación y la fosforilación son clave en la regulación de la especificidad de la interacción del dístroglicano en diferentes tejidos y en diferentes etapas del desarrollo.

Se sabe que Dg, se expresa en muchos otros tipos celulares y desempeña funciones implicadas en el desarrollo, estructura, función y morfogénesis (7, 9). Por consiguiente la alteración o la ausencia de Dg se ha asociado a diversas

alteraciones en la producción de Dg con severos desordenes congénitos y de la arquitectura celular además de progresión de células cancerosas. Hasta ahora, no se han identificado mutaciones en el gen del Dg, los avances recientes han subrayado la importancia del procesamiento post-traducciona para la interacción del Dg con sus ligandos y han brindado pistas sobre el desarrollo de la patogénesis de enfermedades complejas (5,22, 37).

El amplio rango de ligandos extracelulares indica que el Dg tiene una función importante no solo en los altos niveles del desarrollo y tejidos adultos; también en el basamento membranal como receptor y se encuentra involucrado en el ensamblaje, la adhesión celular y los procesos de señalización. Por consiguiente, su ausencia o sus anomalías han sido asociadas con severos desordenes congénitos y progresión del cáncer.

7. Distroglicanopatías y otras patologías relacionadas

Estudios previos en células cancerosas han sugerido que los cambios en la función del distroglicano contribuyen a la progresión y gravedad de la enfermedad. Recientemente se ha mostrado que tejidos sólidos cancerosos de esófago, colon, riñón y mama presentan una marcada reducción de β -Dg, sugiriendo un papel como supresor tumoral (22, 23, 26, 37).

Así mismo, al intervenir como una proteína reguladora de adhesiones focales (9, 10). Su mal funcionamiento juega un papel importante dentro de los tejidos en los que participa. (11,12, 48).

ANTECEDENTES DEL PROYECTO

Hasta ahora no existe evidencia que compruebe la existencia de los complejos proteicos asociados a distrofina en células tallo hematopoyéticas por lo cual incluso se desconoce su posible función. En el presente estudio se propone caracterizar la presencia de los complejos de proteínas asociados a distrofina y utrofina en células tallo hematopoyéticas CD34⁺ y compararlas con las células de médula ósea de individuos con LMC en fase crónica.

Se ha observado, en estudios previos con células cancerosas, cambios en la glucosilación, expresión y distribución del distroglicano; lo cual ha sugerido que esta proteína del citoesqueleto podría estar contribuyendo a la progresión y gravedad de la enfermedad. En muestras de tejidos cancerosos de esófago, colon, riñón y mama se presentó una marcada reducción de beta distroglicano, sugiriendo su papel como un supresor tumoral (23, 36, 57).

A la fecha se ha estudiado la presencia y posible función de estos en células diferenciadas del tejido sanguíneo como plaquetas y neutrófilos. En plaquetas se ha caracterizado la presencia de β -distroglicano como parte de los complejos de proteínas asociados a distrofina y utrofina. Estas investigaciones sugieren que los distroglicanos se presentan entre los sistemas de actina y microtúbulos participando como una proteína reguladora de las adhesiones focales (2, 6, 7).

En neutrófilos, se ha descrito la presencia de complejos asociados a distrofina y utrofina; así como la presencia de especies fosforiladas de β -distroglicano en neutrófilos activados lo cual hace pensar que pueden tener importancia durante los procesos de fagocitosis (14), sin embargo, se desconoce la presencia y función de estos complejos en células progenitoras.

JUSTIFICACIÓN

Las distroglicanopatías son un grupo de enfermedades heredadas que tienen un mecanismo común subyacente: alteraciones en la función o estructura del Dg. El Dg se ha implicado en el desarrollo embrionario temprano, en la estructura y función del SNC, en los procesos de mielinización y en la arquitectura nodal del SNP, en la morfogénesis epitelial, la adhesión celular y los procesos de señalización. Por consiguiente, su ausencia o anomalías han sido asociadas con severos desordenes congénitos y progresión del cáncer. En el cáncer; el Dg juega un papel importante en la membrana basal y en conjunto con las células epiteliales a través del contacto con la ECM. Numerosos cánceres de origen epitelial y neuronal fueron el resultado de una asociación entre la pérdida de las subunidades de Dg y la progresión del tumor. Por lo tanto es posible que los distroglicanos como proteínas de localización transmembranal y dominios intra y extracitoplásmicos, puedan presentar una participación dinámica en los procesos de adhesión, migración, proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺ sanos. Por esta razón podríamos considerar que los mecanismos de adhesión y proliferación de las células CD34⁺ presentes en los pacientes con LMC se encuentran alterados debido a una disminución o modificación de distroglicanos. Esperamos que nuestros resultados puedan aportar mecanismos fisiopatológicos novedosos con respecto a esta enfermedad y que constituyan las primeras bases que permitan proponer terapias alternativas para contrarrestar los efectos clínicos en la LMC.

HIPÓTESIS

La disminución en la adhesión de las células CD34⁺ al estroma de la médula ósea de pacientes con LMC es provocada por una disminución de α - y β -Distroglicanos, lo cual contribuye a una proliferación incontrolada de los precursores y a la manifestación de la enfermedad.

OBJETIVOS

General:

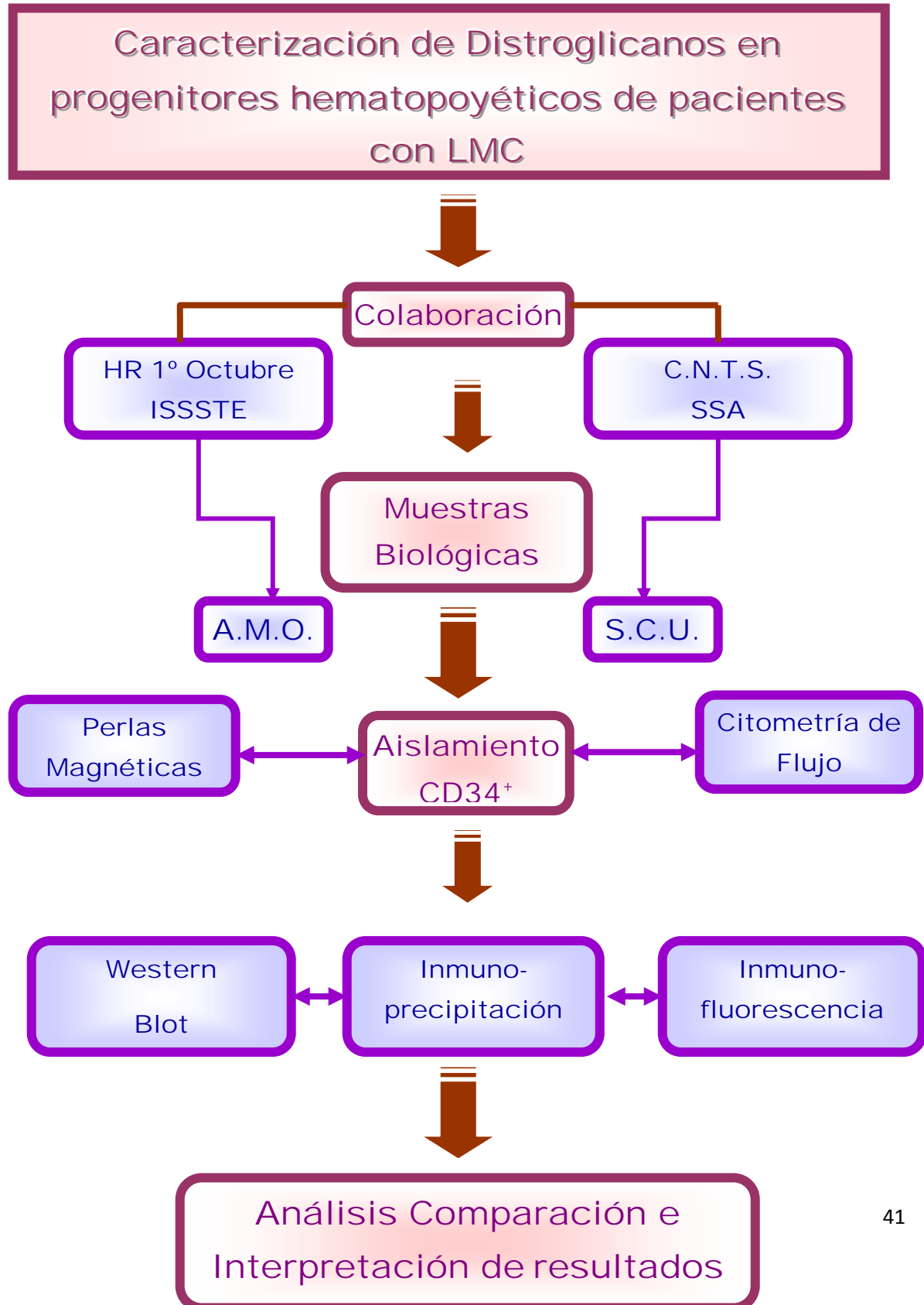
Evaluar la presencia de α - y β -dístroglicano en progenitores hematopoyéticos de pacientes con LMC.

Específicos:

1.- Caracterizar la expresión y distribución de los dístroglicanos y proteínas asociadas en células progenitoras hematopoyéticas sanas.

2.- Caracterizar la expresión y distribución de los dístroglicanos en células progenitoras con LMC.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



METODOLOGIA

Diseño del estudio

- Experimental
- Prospectivo

Población y tamaño de la muestra

- **Grupo problema:** Se obtuvo por consentimiento informado muestras de médula ósea de pacientes con LMC de recién diagnóstico sin tratamiento previo.
- **Grupo control:** Las muestras control se obtuvieron de unidades de sangre de cordón umbilical (SCU); de recién nacidos sanos, que no fueron requeridas para trasplante por el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS).

Criterios de inclusión:

- Bajo la colaboración y los preceptos éticos con los que se rige el Hospital Regional 1º de Octubre ISSSTE: se incluyeron pacientes que estuvieran de acuerdo en participar en el proyecto y que cumplieran con los siguientes requisitos:

- Diagnóstico reciente de LMC corroborado por el hospital mediante la detección del cromosoma Filadelfia (Ph) por RT-PCR.
- Pacientes sin tratamiento previo al momento del diagnóstico.
- Pacientes con diagnóstico de fase acelerada y/o crisis blástica.

- Pacientes atendidos en la sección de Hematología de dicho hospital y que deseaban colaborar con el proyecto.
- Por colaboración con el Instituto Nacional de la Transfusión Sanguínea SSA y bajo sus estatutos; se obtuvieron unidades de sangre de cordón umbilical (USC); las cuales fueron utilizadas bajo las condiciones de bioseguridad especificadas por dicho instituto y bajo las normas generales de manejo de material infectocontagioso.
- Sangre de cordón umbilical de reciente extracción (no más de 48 horas).
 - Adecuadamente almacenada en bolsa contenedora (Grifols^{MR})
 - Que contuviera anticoagulante para su manejo y estuviera libre de coágulos.
 - Que no se requiriera para transplante pero con células viables para la realización de los experimentos.

Criterios de exclusión

- Grupo problema:

- Pacientes que no deseaban participar en el proyecto.
- Pacientes con diagnóstico de Leucemia que no cumplieron con los requisitos de ser Mieloide y Crónica.
- Pacientes que no presentaron diagnóstico reciente de Leucemia Mieloide Crónica (LMC) o que su diagnóstico sea dudoso.

- Grupo control:

- Unidades de SCU con defectos en su almacenamiento.
- Unidades de SCU de más de 3 días de extracción.
- Unidades de SCU que fueran requerida por la institución para trasplante.
- Unidades de SCU sin anticoagulante o que a pesar del mismo tuviera coágulos.

Criterios de eliminación

- Grupo problema:

- Pacientes en tratamiento de LMC.
- Pacientes con otra variedad de leucemia.
- Pacientes que decidieran retirarse del proyecto.

-Grupo control:

- SCU que presentara alteraciones celulares.
- Unidades de SCU sin registro y fecha de recolección.
- SCU con alto número de glóbulos rojos lisados.

MATERIALES

Materiales utilizados para técnicas establecidas con células tallo hematopoyéticas humanas

Tabla 1: Material Utilizado para la purificación de CD34⁺	
☞ Bolsa contenedora para SCU Grifols. ^{MR}	☞ Ficoll Hypack
☞ CPD-150	☞ PBS pH 7.4*
☞ Dynabeads CD34 ⁺ (Dyna ^{MR} Invitrogen)	☞ Solución Reductora de células agregadas*
☞ Solución separadora de afinidad de perlas (Dyna ^{MR} Invitrogen)	☞ Buffer de lisis de Eritrocitos*
* Todos los reactivos y sales utilizados son de Sigma-Aldrich Chemicals®	

Tabla 2: Materiales para técnica de Inmunofluorescencia	
☞ p-formaldehído al 2%*	☞ NP40*
☞ PBS- albúmina 0.1%*	☞ Anticuerpos Primarios. (Ver tabla 5)
☞ Esmalte transparente.	☞ Vectashield
* Todos los reactivos y sales utilizados son de Sigma-Aldrich Chemicals®	

Tabla 2.1: Anticuerpos secundarios	
☞ Falacidina	☞ Texas Red Iso-Thiocyanate (TRICT)
☞ Fluorescein Iso-Thiocyanate (FITC)	☞ 4',6-diaminodino-2-phenylindole (DAPI)
* Todos los anticuerpos presentados en la tabla y utilizados son Santa Cruz Biotechnology®	

Tabla 3: Materiales para Western blot	
☞ Agua bidestilada	☞ Buffer de Lisis 5X
☞ Protease inhibitor mix	☞ TBS-T 1%
☞ PSMF	☞ Anticuerpos primarios
☞ Buffer de carga 2X	☞ Anticuerpos secundarios:
☞ Gel de Acrilamida 10%	☞ Hourse rabbit peroxidase (HRP)
☞ Buffer de Electroforesis	☞ Placas Kodak ^{MR}
☞ TBS-T 1%	☞ Luminol
Anticuerpos primarios (Ver tabla 5)	Anticuerpos secundarios
* Todos los reactivos y sales utilizados son de Sigma-Aldrich Chemicals [®]	

Tabla 4: Materiales para Inmunoprecipitación	
☞ Pool de proteínas con SCU	☞ Perlas de proteína G sefarosa
☞ Anticuerpo Inmunoprecipitante	☞ Anticuerpo Irrelevante
☞ Buffer de lisis l detergente	☞ Buffer de lavado
* Todos los reactivos y sales utilizados son de Sigma-Aldrich Chemicals [®]	

Tabla 5. Características de los anticuerpos primarios

Anticuerpo	Inmunógeno	Especificidad	Referencia
Actina C-2 pAb	C-T	Actina	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA).
H4 pAb	últimos 11aa del C-T	Todas las distrofinas	Daloz et al., 2003.
Dys2 mAb	Últimos 27 aa del C-T	Todas las distrofinas	Novocastra (New Castle,UK)
Utrofina mAb 3B6	Últimos 261-371aa	Utrofina de humano y rata	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA).
K7 pAb	Últimos 15 aa del C-T	Todas las utrofinas	Daloz et al., 2003
JAF pAb	Últimos 7 aa del C-T	β -Distroglicano	Rivier et al., 1997
α -distroglicano H-3000	Reconoce el épitope cercano a 300-329 aa cerca del N-T	α -Distroglicano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA).
α -distrobrevina V-19	Reconoce el épitope cercano al C-T	α – distrobrevina de humano subunidad α, δ, ϵ y C_2C_{12}	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA).
α -Db pAb	Últimos 10 aa del C-T	α – distrobrevina	Peters et al., 1997
α -Sintrofina C-16	Reconoce el épitope cercano al C-T	α –sintrofinas de humano	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA).
α -Sintrofina C4 pAb	Péptido 191-206	Todas las α sintrofinas	Rivier et al., 1999
mAb, anticuerpo monoclonal; pAb, anticuerpo policlonal; C-T, COOH-terminal; N-T, NH ₂ -terminal.			

Materiales para Citometría de Flujo

Amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.4)

Anticuerpos primarios (Ver tabla 5)

Tabla 6. Características de anticuerpo para citometría de flujo.

Cluster of differentiation	Fluorocromo	Expresión
CD34 ⁺ Humano	R-PE Phycoerythrin conjugado	Marcador de membrana de Células Tallo Hematopoyéticas

1

¹ * Todos los materiales y reactivos requeridos están disponibles en los lugares de trabajo ENMyH IPN.

METODOS

1. Método para aislar Células Sanguíneas.

Una vez obtenida la muestra biológica, (sangre de cordón umbilical SCU o Médula ósea MO); ésta se transportó y manejó en red fría a 4°C:

La sangre total fue examinada a simple vista para descartar lisis o coágulos, , posteriormente se centrifugó a 700 rpm por 10 minutos, para retirar las plaquetas y evitar su adhesión a las células de interés, una vez extraído el suero con plaquetas, se repuso volumen con PBS pH 7.4, repitiendo los lavados por triplicado. La sangre libre de suero y plaquetas fue suspendida en 2ml de PBS pH7.4; Solución Reductora de células agregadas (PBS pH 7.4, EDTA 2mM) 1:4 y en tubos cónicos estériles se adicionó Ficoll-Paque Plus^{MR}, seguido de una capa de sangre sin mezclarse, generando una bi-capa que se centrifugó a 1,700 rpm por 35 minutos.

Ficoll-Paque Plus^{MR}; permitió que la sangre fuera separada por gradiente de densidad celular, lo cual formó varios estratos celulares de los cuales extrajo el estrato o anillo que contenía la población de mononucleares. Una vez que fueron extraídos se suspendieron en 5 ml de PBS pH 7.4 y centrifugados por 10 minutos a 500 rpm. Del paso anterior se colectó el precipitado celular desechando el sobrenadante. Una vez formado un botón celular con todas las muestras, se adicionaron 3 ml de PBS y se mantuvieron a 4°C*.

2

² * Este procedimiento se aplicó tanto a células de cordón umbilical como de médula ósea. Para separar células Tallo maduras CD34+ según sea el caso y el tipo de muestra.

1.2 Aislamiento de CD34⁺ en LMC o SCU

Concluida la primera fase de extracción de células mononucleares, para aislar la población de CD34⁺, fueron utilizadas las siguientes técnicas:

1.3 Aislamiento de células CD34⁺ por Perlas Magnéticas

Dentro de la población de células mononucleares previamente obtenidas; fueron aisladas todas aquellas células tallo que contenían en su membrana el marcador celular CD34⁺, por afinidad positiva; mediante reacción antígeno anticuerpo; empleando el kit comercial de perlas magnéticas (CD34⁺ progenitor cell isolation system, Dynal / Becton Dickinson^{MR}).

Se utilizaron 100 µl de perlas por cada 4×10^7 células cuantificadas y se incubaron durante 35 minutos en agitación a 4°C; lo que permitió que fuera reconocido el marcador CD34⁺ en aquellas células mononucleares que lo contenían. Concluido el periodo de incubación las perlas unidas a la población celular de interés, fueron colocadas en un magneto que permitió aislar a las células que contenían el marcador CD34⁺, del resto de poblaciones existentes. Una vez que han sido aisladas las células con las perlas, estas fueron incubadas por 45 minutos en buffer para eliminación de perlas Detachabead, Dynal^{MR} (El cual rompió la afinidad entre las células y las perlas). Posteriormente se rescató el sobrenadante que contenía las células tallo hematopoyéticas.

1.4 Cuantificación de células CD34⁺ en citómetro de flujo FACS calibur

Para corroborar que se aisló una población de CD34⁺; las células mononucleares previamente aisladas se marcaron con anticuerpos CD34⁺ PE, (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA) a una concentración de 1µL X 1,000 000 de células

cuantificadas, se incubaron durante 45 minutos y posteriormente fueron lavadas y resuspendidas en PBS pH 7.4 a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lavadas y suspendidas en buffer de tinción antes de su análisis por medio del citómetro de flujo FACS Calibur, con lo que se corroboró la pureza de la población en estudio.

2. Evaluación de Distroglicanos y la posible formación de complejos con proteínas asociadas.

Una vez obtenidas las células tallo con el correspondiente marcador CD34⁺; fue evaluada la viabilidad celular mediante la observación por microscopio y tinción celular con azul de tripán. Por medio de esta técnica se decidió que experimentos eran los más apropiados para la muestra obtenida.

En caso de realizarse lisado total de proteínas para Western blot o Inmunoprecipitación; el lisado total de proteínas fue cuantificado, con el kit comercial BSA Proteín Assay (by Thermo) para Nanodrop^{MR}.

Durante la cuantificación de los lisados totales, se observó baja concentración proteica en los extractos obtenidos; esto secundario a una baja población de células tallo CD34⁺ en SCU (equivalente a 0.3% del volumen total) por muestra; motivo por el cual, se tomó la decisión de realizar un pool de proteínas compuesto por un total de 6 unidades de SCU para el caso de los grupos control; para poder disponer de una cantidad de proteína total adecuada para inmuno análisis.

2.1. Análisis por Western-blot

2x10⁵ células fueron lisadas en Buffer de solubilización (100 mM Tris, 5Mm MgCl₂, 200 mM ditiotreitól, y SDS al 4%) el cual contenía 100 mM NaF, 10 mM

pirofosfato de sodio y 2mM de Na_3VO_4 , 4mM etilén-diamino-tetra-acético, 1% de tritón. Adicionalmente se sonicó la muestra por 15 segundos durante 3 ciclos y se mezcló con buffer de carga para proteínas (Tris-Cl/SDS pH 6.8 4X, 3000 μl de Glicerol al 30%, 2- β , Mercapto etanol 600 μl , SDS 10%, 1,200 μl de azul de bromofenol). Fueron realizados geles con poliacrilamida al 10% y se agregó un marcador de peso molecular junto con la solución que contiene las proteínas; fueron cargados en cada pozo 120 a 150 μg de extracto total de proteína, (previamente cuantificadas por curva de absorbancia) y se aplicó el principio de electroforesis a las mismas.

Posterior a este paso las proteínas del gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de papel de nitrocelulosa por medio de una cámara de transferencia semi-seca durante 1 hora, una vez completado el tiempo de transferencia, la membrana fue teñida con rojo de Ponceau, para corroborar que la transferencia de las proteínas haya tenido éxito. Para retirar el rojo de Ponceau la membrana fue lavada con TBS-T al 1x durante 5,10 y 15 minutos y posteriormente incubada en caseinato de calcio con TBS-T al 10% (sol. Amortiguadora) por 1 hora, una vez cumplido el tiempo de incubación, fueron realizados lavados con TBS-T durante 5,10 y 15 minutos. Terminado el tiempo de lavado, la membrana se incubó con anticuerpos primarios a concentraciones de 1:500 μL durante 24 horas en agitación a 4°C. La membrana se lavó nuevamente durante 5, 10 y 15 minutos con TBS-T a temperatura ambiente y fue incubada nuevamente con anticuerpos secundarios 1:30,000 durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente, terminado el tiempo de incubación se realizaron lavados con TBS-T nuevamente. Para el registro de los complejos estudiados, terminados los tiempos de incubación, se aplicó una solución de color marcada con peroxidasa; ECL

Westernlighting Plus Perkin Elmer^{MR}. La cual permitió que las membranas fueran reveladas por el método de quimioluminiscencia y los resultados documentados en placas para revelado Kodak^{MR}.

2.2. Ensayo de Inmunoprecipitación.

Durante 15 minutos fueron lisadas células CD34⁺; suspendidas en un volumen de 200 µL de PBS, con un volumen equivalente de buffer de lisis (EGTA 2 mM, HEPES 100 mM, NaCl 150 mM, Tritón1%, pH 7.4) conteniendo 3 µL de PSMF y 10 µL de inhibidores de proteasas (Mix inhibitor protein^{MR}). Una vez obtenidos 300 µg de lisado total de proteínas, este fue incubado por 24 horas a 4°C en agitación con perlas de proteína G-sefarosa previamente equilibradas y los anticuerpos inmunoprecipitantes correspondientes Actina C2, Distrofina Dys2 y Utrofina 3B6. Los inmunoprecipitados fueron separados por centrifugación, lavados con buffer libre de NP-40; re-suspendidos en buffer de carga (125 mM Tris HCl, 4% SDS, 20 % glicerol, 0.01 mg/ml β-mercaptoetanol y azul de bromofenol, pH 6.8) y sometidos a una temperatura de 98°C por 5 minutos. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por Western blot como ya fue descrito.

2.3. Técnica de Inmunofluorescencia.

CD34⁺ fueron fijadas en cubre objetos (previamente limpios con agua destilada, etanol y tratados con Poli D Lisina) con una mezcla de p-formaldehído al 2%, en solución de estabilizadora de citoesqueleto, PHEM (PIPES100 mM, HEPES 5,25 mM, EGTA10 mM, MgCl₂ 20 mM, pH 6,9) y NP-40 al 0.2% durante 2 minutos (8).

Una vez fijas al cubre objetos, CD34⁺ fueron lavadas con PBS pH 7.4 e incubadas con suero bovino fetal (BSA) al 0.5% por 20 minutos, completado el tiempo de

incubación se realizó nuevamente un lavado con PBS y se incubó durante 2 horas con anticuerpos primarios en dilución con PBS. Posterior al primer tiempo de incubación y un lavado previo de PBS, durante 1 hora se realizó una nueva incubación con 0,1 mg/ml FITC (Fluorescein isotiocianato), anticuerpo secundario y falacidina para marcar los filamentos de actina, seguido de lavados con PBS pH 7.4 e incubación durante 1 hora con DAPI para la tinción de los nucleos.

Posterior a la tinción de las células en estudio, las muestras fueron protegidas de la luz y cubiertas con un porta objetos que contenía 7 μ L de Vectashield, encargado de fijar y mantener la fluorescencia de las muestras hasta el momento de su análisis. El análisis de las células se realizó por microscopía confocal (Microscopio Leica modelo TCS SP5 Tandem Multifotónico^{MR}; objetivo 63X, plan neofluar 1.4AN, zoom 4X); con el objetivo de dar a conocer la distribución topográfica dentro de la célula de nuestras proteínas asociadas y su relación con las proteínas del citoesqueleto.

RESULTADOS

El patrón de expresión y la distribución del Dg (α y β), distrofina, utrofina, distrobrevina, y sintrofina; fueron analizadas por ensayos de Western blot y por microscopia confocal, para los cuales fueron utilizados en todos los casos anticuerpos específicos dirigidos contra el epítipo de la proteína que deseábamos caracterizar; así mismo en todos los casos, se utilizaron células C2C12 como muestra control para corroborar la existencia de nuestras proteínas de interés, así como el adecuado manejo de la técnica de Western blot.

1. La forma corta Dp71 está presente en células tallo hematopoyéticas (CD34⁺) humanas y co-localizan con filamentos de actina.

El patrón de expresión y la distribución de distrofina, fueron analizadas por ensayos Western blot y por microscopia confocal (Figura 5), para los cuales fueron utilizados anticuerpos dirigidos al epítipo localizado en la región C- terminal de la distrofina (Dys2, H4) por lo que fue posible detectar la presencia de la forma corta de la proteína. En ensayos de Western-blot; se requirió concentrar lisados proteicos provenientes de diferentes bolsas de sangre de cordón umbilical; ya que las células tallo seleccionadas obtenidas de esta fuente asciende únicamente a un 0.3% de la población total de mononucleares, independientemente del procedimiento empleado para su purificación ya sea perlas magnéticas o citometría de flujo (44, 45). Cabe señalar que en estos ensayos se empleó un lisado control positivo, perteneciente a una línea celular de músculo (C2C12).

El patrón de expresión detectado al emplear el anticuerpo H4 dirigido contra todas las distrofinas, mostró la presencia de bandas sugestivas para la proteína Dp116,

una banda de 71kDa correspondiente a la isoforma Dp71d así como una banda tenue de 55 kDa que podría corresponder a Dp71 Δ_{110}^m las cuales co-migraron con el lisado control de células C2C12.

En relación a la morfología de las células tallo (CD34⁺), como se puede ver en cada uno de los cortes e imágenes de microscopia confocal, son células de forma redonda con núcleos grandes, de bordes uniformes y escaso citoplasma, sin embargo estas células aun manteniendo este patrón morfológico jamás son idénticas entre sí y pueden presentar ligeras variantes en morfología; dando lugar a formas en algunos casos muy redondeadas y en otras ligeramente alargadas o en forma de elipse, sin que esto signifique que pierdan el patrón morfológico que las caracteriza y que es constante en cada una de ellas: núcleos grandes regulares y poco citoplasma; denotando de este modo que se trata de una célula poco diferenciada, especializada o muy joven dentro del proceso de diferenciación celular. Finalmente lo que se observa en azul, corresponde a la ubicación del núcleo el cual de forma constante mantiene un gran tamaño y sus bordes en todo momento están bien definidos.

Para conocer la distribución de las isoformas de distrofina en relación con el citoesqueleto de actina se realizaron inmunofluorescencias y se procedió a emplear falacidina marcada con tetrametil isotiocianato de rodamina (TRITC), y un anticuerpo anti-distrofina el cual puede identificar cualquiera de las proteínas antes mencionadas Dp114, Dp71d, Dp Δ_{110}^m , y revelado con un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína.

En virtud de que por Western blot la proteína más abundante del sistema correspondió a Dp71d la localización de las proteínas detectadas con el anticuerpo

H4 será referida como Dp71d (Figura 5). Así mismo los núcleos celulares se tiñeron empleando el diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

En el presente apartado se describe la distribución de actina filamentosa en células CD34⁺ de cordón umbilical, la cual es similar en todos los resultados de este tipo por lo que en ulteriores apartados ya no será descrita.

La actina filamentosa (actina) se localizó principalmente en la membrana plasmática y región sub-membranal con una distribución homogénea sobre esta, observándose zonas menos compactas de actina en la región citoplásmica. La distribución de Dp71d (Dph) se mostró como un patrón punteado localizado en la región sub-membranal y en citoplasma.

Las imágenes sobrelapadas mostraron zonas de co-localización entre la Dp71d y actina filamentosa a nivel de la región sub-membranosa, cabe señalar que la distribución correspondiente a actina filamentosa y a Dp71d localizada en el citoplasma co-localizan en la región del núcleo en el mismo corte focal (Figura 5, merge).

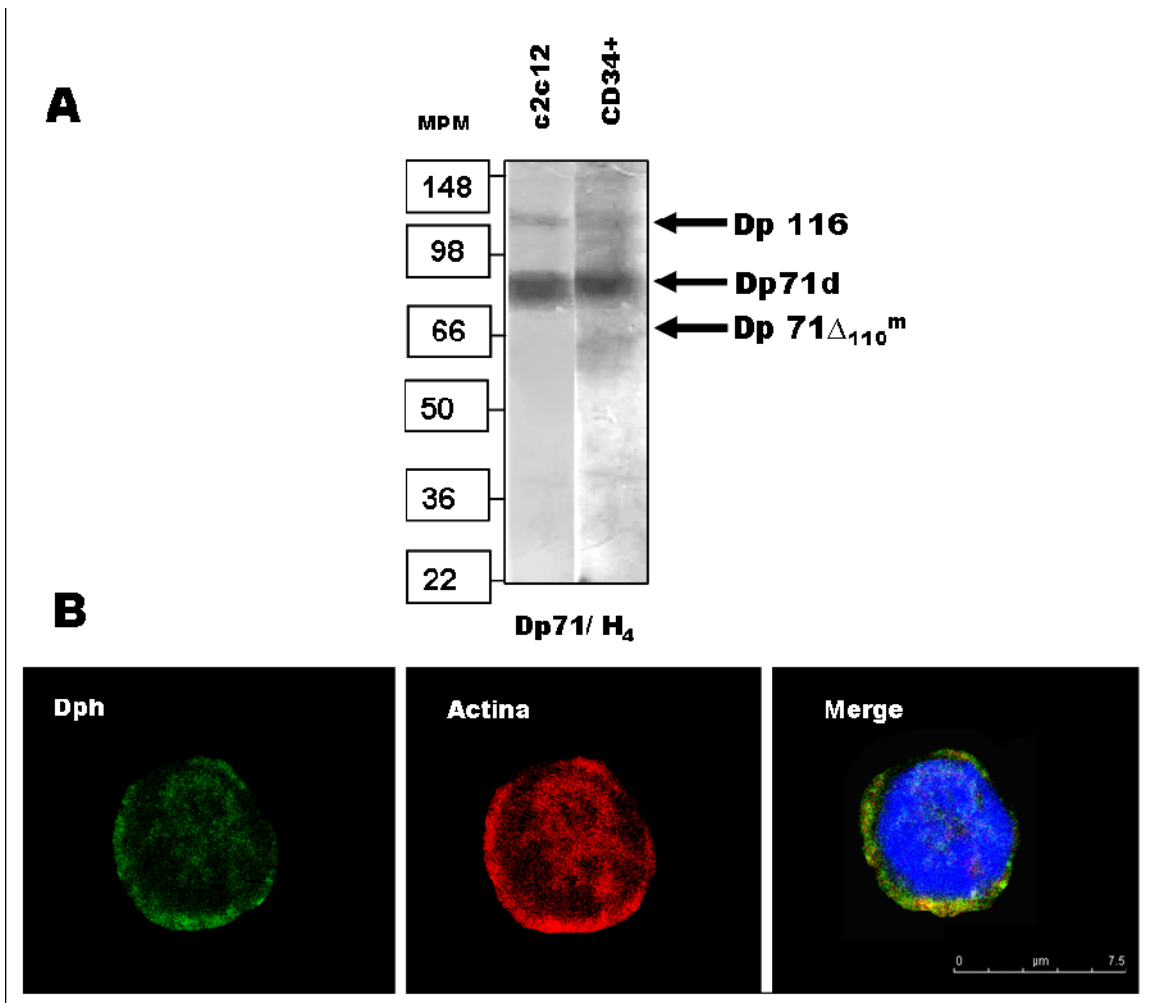


Figura 5: Caracterización de la proteína Distrofina (Dp): Marcado con la letra **A** se observa caracterización por Western blot de la proteína Distrofina. En el primer carril se observa el control positivo con extracto total de C2C12 donde es posible ver la presencia de Dp116 y Dp71d; en el segundo carril es posible observar los extractos totales de CD34⁺ en donde se identifican: Dp116 y Dp71 y a su vez las isoformas Dp71d y Dp71 Δ_{110}^m . Marcado con la letra **B** (en escala igual a 7.5 μm), por microscopía confocal es posible observar la distribución de Distrofina en toda la superficie celular (verde), en el segundo plano focal se observa la presencia y distribución de actina filamentosa (rojo) y en el tercer plano por medio del merge (amarillo); es posible observar los sitios de interacción de ambas proteínas en la superficie del citoesqueleto celular.

2. La Utrofina está presente en células tallo de sangre de cordón umbilical y co-localiza con filamentos de actina.

Para identificar los productos de la proteína utrofina (Up), nuevamente fueron utilizados los lisados totales de células C2C12 como sistema control y células tallo CD34⁺. Mediante análisis por Western blot, empleando el anticuerpo K7 el cual detecta todas las utrofinas ya que esta dirigido al epítotope localizado en el C-terminal de esta proteína. Respectivamente fueron detectadas tres bandas de 395 kDa, 140 kDa y 71 kDa, en C2C12; mientras que las bandas detectadas en la columna correspondiente al lisado de CD34⁺; corresponden a los pesos de 395 kDa y 140 kDa; en este caso, no se encontró la banda correspondiente a Up71 con un peso molecular aproximado de 71 kDa (Figura 6). Por medio de ensayos de inmunofluorescencia, se conoció la distribución de utrofina con actina utilizado el anticuerpo anti-utrofina (K7) revelado con un anticuerpo secundario acoplado a FITC y falacidina-TRITC para ubicar actina filamentosa (Figura 6, derecha). En los planos focales utilizados; podemos observar la localización de Up400/Up140 en toda la región citoplasmática y sub-membranal, manteniendo un patrón con un puntillado uniforme y con ligeros cúmulos en la región nuclear. La sobre-posición de las imágenes es indicativa de una posible interacción de Up400/Up140 tanto en regiones citoplásmicas como en zonas nucleares.

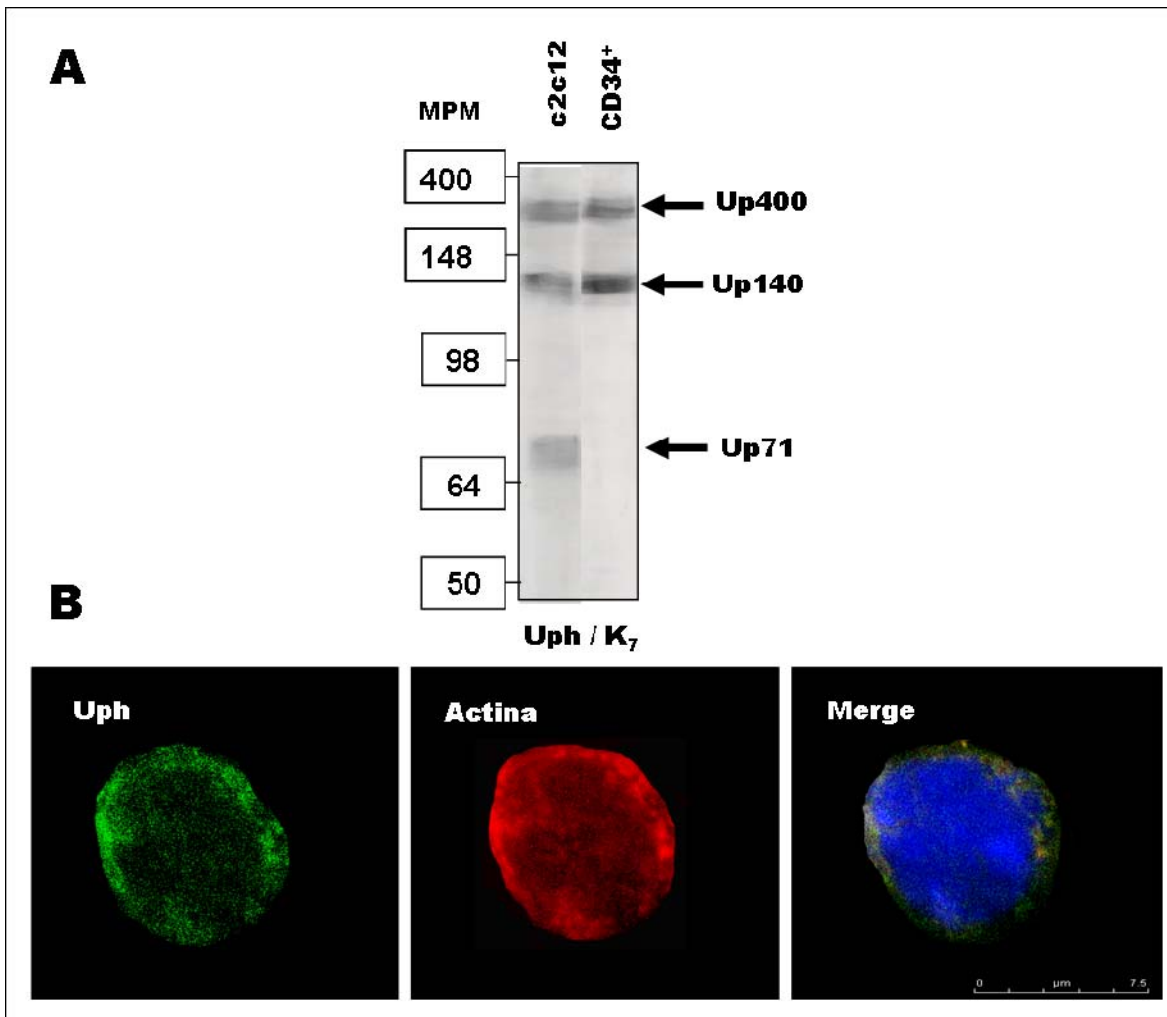


Figura 6: Caracterización de la proteína utrofina (Up): Nuevamente con la letra **A** en la parte superior, es posible observar la caracterización de Up homóloga de Dp por Western blot; así mismo en el extracto control de C2C12, se observan las formas correspondientes a Up400, Up140 y Up71; a diferencia de CD34+, en donde solo están presentes Up400 y Up140 y es posible observar la ausencia de Up71. En la sección de abajo, letra **B** (Esc =7.5μm) por microscopía confocal es posible observar 3 proyecciones de CD34+ en las cuales se identifica en la primera imagen la distribución de utrofina, en la segunda la presencia y extensión de actina filamentosa y en el merge la interacción de ambas proteínas, en lugares estratégicos de la submembrana.

3. El β -Distroglicano está presente en células tallo humanas de sangre de cordón umbilical.

Para la caracterización de β -distroglicano se utilizó el anticuerpo anti β -distroglicano JAF, el cual ubica la subunidad beta, que posee los dominios transmembranal y citoplasmático. En este caso el control positivo fue nuevamente C2C12 en la cual podemos observar que está presente una banda gruesa de 43 kDa, correspondiente al peso de la proteína encontrado en otros sistemas. Sin embargo, en el lisado total de células tallo es posible ver que de manera sistemática, la proteína obtenida presenta un peso molecular correspondiente a 52 kDa (Figura 7). En relación al análisis topográfico por inmunofluorescencia, se pudo apreciar la ubicación del beta-distroglicano tanto en la región membranal como en el núcleo; próximo a la membrana nuclear, esto puede ser concluido mediante la observación de un patrón punteado difuso pero a su vez intenso identificado por FITC presente en el primer plano focal y en el merge, así como cúmulos en regiones correspondientes al núcleo, lo cual es muy evidente al observar las imágenes sobre-puestas en las que se incluye la tinción con DAPI.

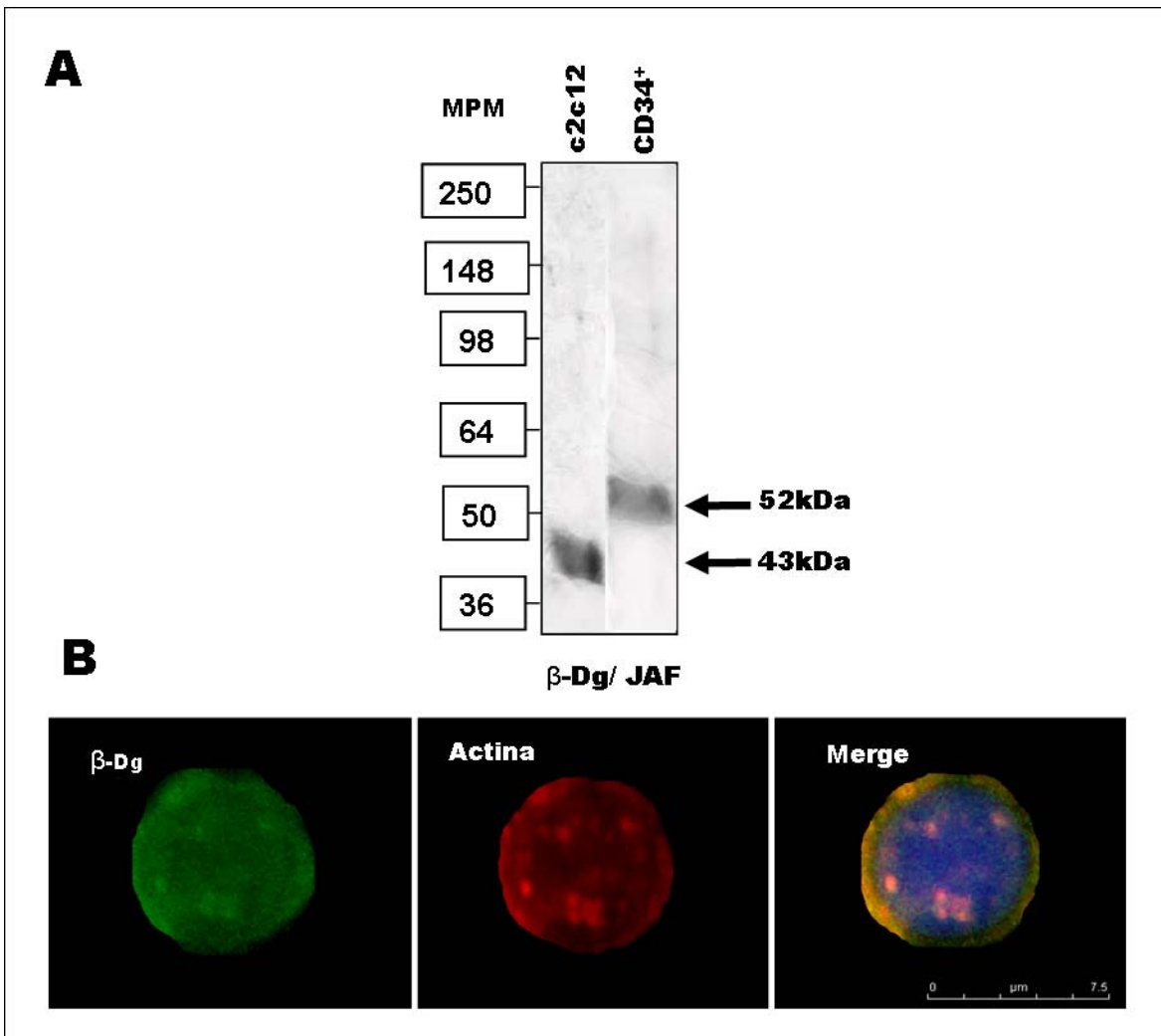


Figura 7: Caracterización de β -dístroglicano (β -Dg) en C2C12 y CD34⁺ respectivamente; en la parte izquierda (letra **A**) se muestra por Western blot la presencia de una banda de 43kDa correspondientes a β -Dg en extractos de C2C12; por el contrario en el segundo carril es posible observar una banda de 52 kDa la cual corresponde a β -Dg. En **B**, se observa la morfología de una célula CD34⁺ (Esc =7.5 μ m) de SCU y la presencia de β -Dg en dicha célula, en verde, en la cual es posible identificar la distribución en la submembrana y en ciertas regiones centrales que corresponden al núcleo; en el segundo plano focal, se observa actina filamentosa en toda la extensión celular. Durante el análisis del tercer plano (merge) es posible corroborar la interacción de ambas proteínas en el citoesqueleto celular y también su presencia nuclear.

4. α -dístroglicano esta presente en células tallo humanas de sangre de cordón umbilical.

α -dístroglicano (α -Dg) es una proteína extra-membranal que tiene la función primordial de comunicar a la célula con la matriz extracelular; ya que se une a laminina α -2 en su dominio externo y a su vez está unida a la subunidad β , dentro de la célula. Los pesos moleculares que se han descrito para α -Dg; son: aproximados a los 156 kDa en tejidos como músculo y cerebro; también se le ha reportado con un peso de 120 kDa en ciertas regiones del SN, hígado y plaquetas (7,21,26,53). Para la caracterización de α -Dg por western blot; fue utilizado nuevamente como control el lisado total de células C2C12 y lisado de células CD34⁺ para identificar sus pesos moleculares, en las células de interés. El anticuerpo utilizado fue anti- α -Dg, que reconocen un epítoto cercano a los 300-329 aa cerca del extremo N-terminal. En ambos casos fueron encontradas bandas de peso molecular variado: para C2C12 se encontró una banda correspondiente a los 156 kDa y dos bandas adicionales de 100 kDa y de 80 kDa, estas dos últimas no corresponden a los pesos moleculares esperados, mientras que en células CD34⁺, se encontraron de la misma manera, 3 bandas correspondientes a los siguientes pesos moleculares una banda de 80 kDa, una de 120 kDa y la última de 156 kDa (Figura 8). Para su distribución topográfica por microscopía confocal; se utilizó como anticuerpo primario, anti- α -dístroglicano; el cual ubica específicamente a la subunidad alfa; posteriormente fue revelado con un anticuerpo secundario acoplado a FITC y se utilizó nuevamente falacidina para teñir actina filamentosa. El α -Dg, se distribuye a lo largo de la membrana celular; sin embargo es interesante observar que la proteína se aglutina o se concentra en ciertas regiones con respecto al resto de la membrana celular (flecha arriba). La

sobreposición de las imágenes de los cortes celulares (merge) mostró cercanía entre actina y α -Dg; sin presentar una franca interacción o co-localización dado por el patrón de fluorescencia. En el resto de la membrana celular es posible ver la expresión de α -Dg el cual esta ubicado por completo sobre la membrana y no presenta interacción ni co-localización con actina filamentosa (Figura 8).

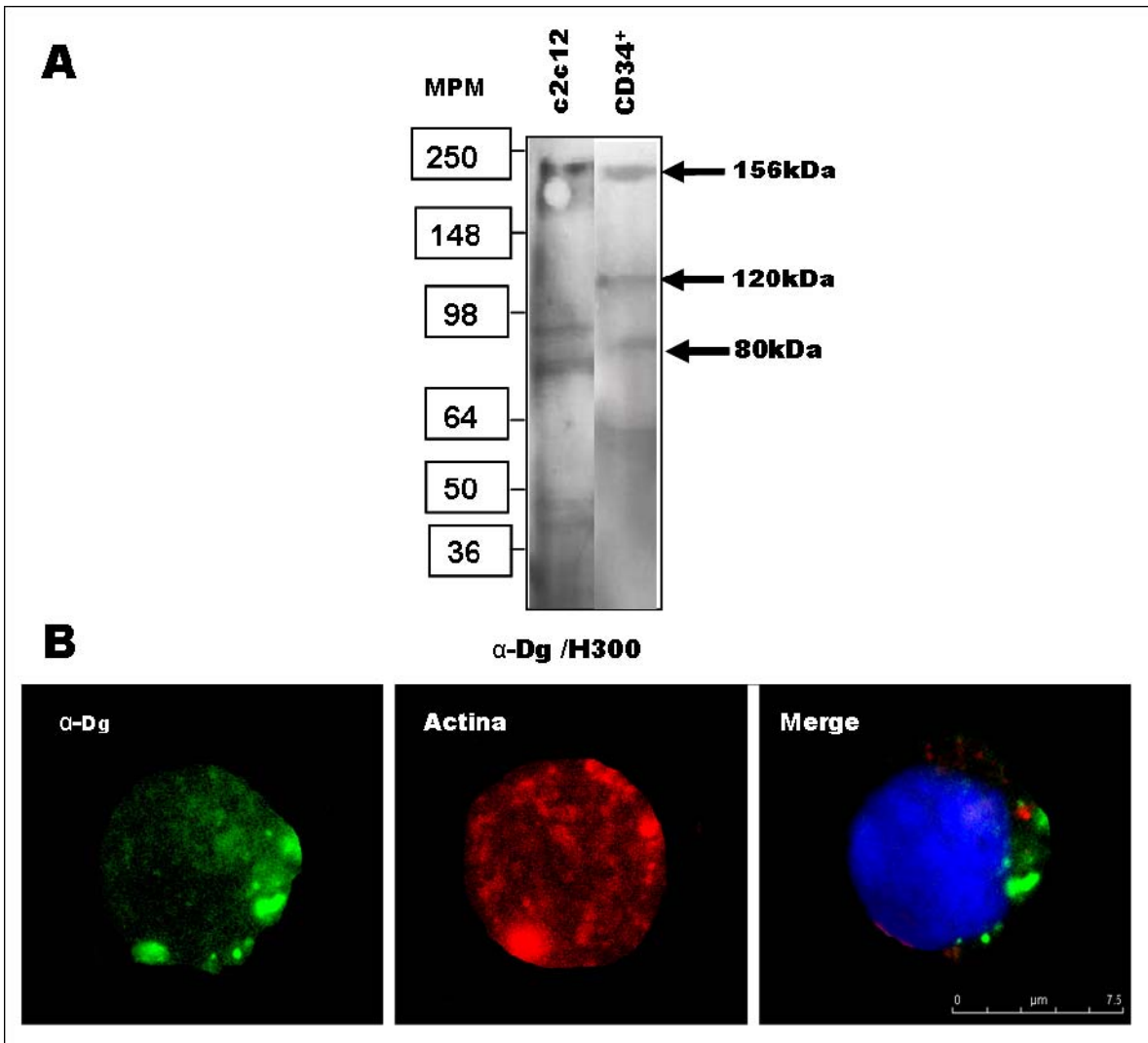


Figura 8: Caracterización de la proteína α -dístroglicano (α -Dg) perteneciente al DAPC: en la imagen **A**, se caracteriza a la proteína α -Dg por Western blot, obteniendo una banda de 156 kDa, otra de 120 kDa y una tercera de 80 kDa. En la imagen **B** es posible ver por microscopio confocal (Esc.=7.5 μ m), la presencia de α -Dg y su distribución en la periferia de la membrana celular (merge); en el primer plano (verde), se identifica la distribución de dicha proteína en la membrana, en el segundo plano se corrobora la falta de interacción de α -Dg con actina filamentosa, debido a que estas proteínas se encuentran ubicadas en la membrana

extracelular⁺.

5. α -sintrofina esta presente en Células CD34⁺ humanas.

La α -sintrofina es una glucoproteína perteneciente al complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPs); previamente se reportada en plaquetas humanas (4, 56,62) y neutrófilos (10, 13,14), por lo que se buscó identificar la presencia y distribución de dicha proteína además de su interacción con actina por análisis de Western blot y microscopía confocal (Figura 9). La presencia de α -sintrofina en células C2C12 fue comprobada por la utilización del anticuerpo C4 anti α -sintrofina; que permitió observar la presencia de dos bandas de 58 y 59 kDa respectivamente. Así mismo en extractos de C2C12 y de CD34⁺ se encontraron algunas bandas de peso molecular mayor a los que han sido reportados con anterioridad; por lo que podríamos sospechar que se trata de inespecificidades de la técnica ya que no se tiene referencia de las mismas, ni han sido descritas. Por técnica de inmunofluorescencia indirecta se obtuvo la imagen focal en la que se muestra la presencia de α -sintrofina con un patrón de distribución a la región sub-membranal mediante un puntilleo tenue y homogéneo. El merge de las imágenes mostró proximidad de α -sintrofina con los filamentos de actina y por consiguiente su probable cercanía, interacción y co-localización sub-membranal y nuclear (Figura 9).

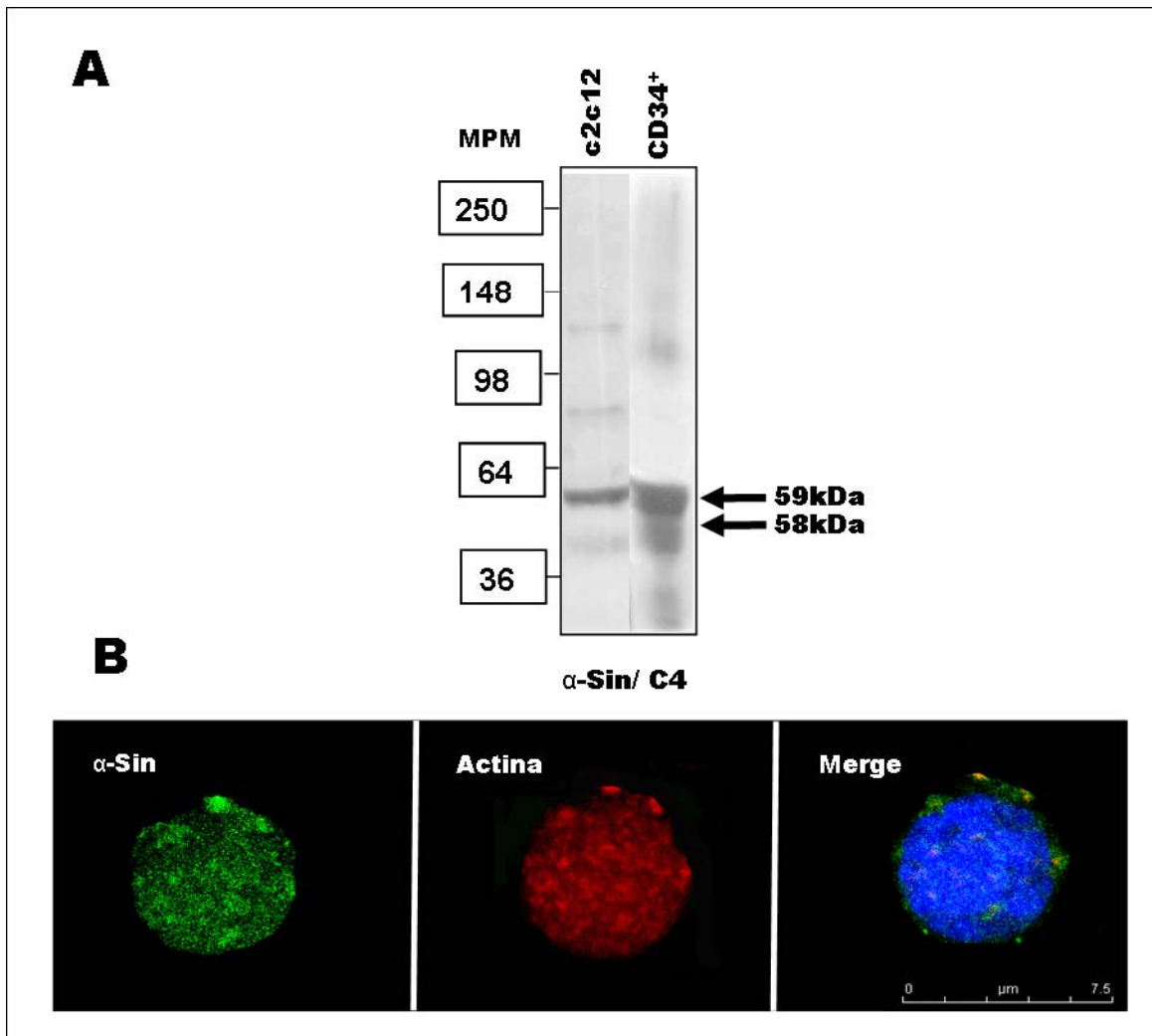


Figura 9: Caracterización de α -sintrofina (α -Sin) en células C2C12 y CD34⁺. En la parte superior **A**, se aprecia por WB en células C2C12, la existencia de dos bandas correspondientes a las posibles isoformas de α -sintrofina, de 59 y 58kDa respectivamente; en el grupo de C2C12 se observan 2 bandas de peso molecular mayor a los descritos y en extractos de CD34⁺, una banda de 94 k Da, por lo que se pudiera sospechar que son inespecíficas. En la figura **B**, (Esc.=7.5 μ m) se aprecia la distribución topográfica de α -sintrofina por microscopio confocal; cabe resaltar que la proteína está ubicada en la sub-membrana y aparentemente no es abundante.

6. α -Distrobrevina esta presente en Células tallo humanas de SCU.

α -distrobrevina (α -Db) es una proteína citoplásmica que también forma parte del complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPs) e interactúa estrechamente con Dp, Up y sintrofina. Para caracterizarla por Western blot, fue utilizado un anticuerpo anti α -Db (V-19) dirigido al epítoto cercano a los últimos aa del C-terminal. Tanto en el lisado total de proteínas control (C2C12), como en el lisado en estudio (CD34⁺), se observó una banda única de 84 kDa (Figura 10). Para evaluar su ubicación dentro de la célula se utilizó el análisis por microscopia confocal empleando nuevamente el anticuerpo primario anti α -Db V-19 que fue teñido con FITC. La presencia de α -Db en células tallo hematopoyéticas es de localización sub-membranal, con una distribución importante en la región nuclear co-localizando con filamentos de actina como puede observarse en el merge de las imágenes correspondientes (Figura 10).

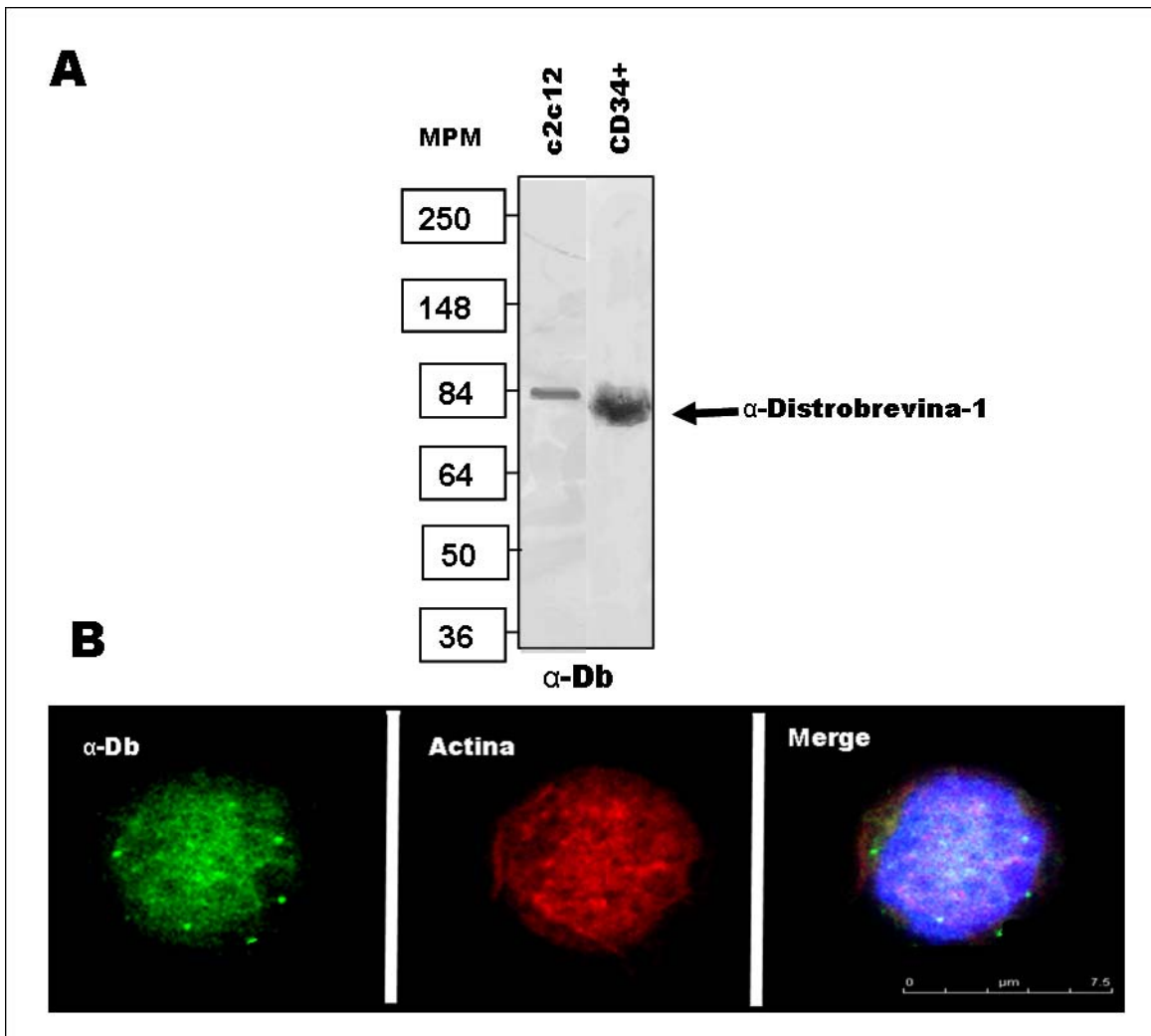


Figura 10: Caracterización de α -Db; proteína perteneciente al DAPC. Por Western blot **A**, se identificó una banda con peso molecular de 84 kDa que corresponde a la presencia de Db en C2C12 y CD34+. En la segunda imagen (Esc.=7.5 μ m) **B**, se aprecia la distribución de Db por inmunofluorescencia por microscopia confocal.

7. Dp colocaliza con β -Dg, α -Db y α -sintrofina respectivamente en Células Tallo Hematopoyéticas.

β -dístroglicano (β -Dg) es una proteína transmembranal de la que se sabe, se encuentra interactuando con moléculas de señalización, así mismo se asocia con distrofina por lo que para poder observar estas interacciones se realizó la técnica de inmunofluorescencia con marcaje doble de anticuerpo primario en el que se tiñó con FITC a Dp71d y con TRITC a las glicoproteínas que conforman el DAPC. En el caso de Dp71d/ β -Dg, podemos observar que la Dp es uniforme en distribución y en intensidad, presentando ligeros aumentos de su concentración en ciertas zonas de la sub-membrana (figura 11). β -dístroglicano se extiende a lo largo de toda la extensión de la membrana celular, esto se comprueba al observar el aumento de intensidad dentro del patrón de distribución en todo el plano celular. Cabe destacar que es visible una tenue acumulación central de β -Dg en citoplasma; la cual al parecer es próxima al núcleo. La sobreposición de imágenes (merge) muestra; que tanto Dp71d como β -Dg están próximos en el citoplasma y co-localizan en la región sub-membranal principalmente (Figura 11).

En el caso de Dp71d/ α -Db; nuevamente el patrón de distribución de Dp71d y α -Db es uniforme y constante en toda la extensión de la célula. En el merge se identifica su co-localización en la región sub-membranosa de la célula (Figura 11). α -sintrofina identificada por su patrón discreto que la identifica hace posible observar pequeños cúmulos de la misma, mientras que en el merge es evidente su proximidad con Dp71d y su probable interacción (Figura 11).

Para comprobar la interacción del DAPC con Dp71d en las células CD34⁺; así

como lo observado en las imágenes de microscopía confocal, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación en los cuales nuevamente se utilizó un pool de proteínas de extractos totales de CD34⁺ (E), así como el inmunoprecipitado (Ip) y revelada mediante la técnica de Wb empleando anticuerpos dirigidos contra distrofina y el DAPC (β -dístroglicano, α -dístrobrevina y α -sintrofina). Las bandas reveladas con el anticuerpo H4 tanto en el inmunoprecipitado como en el extracto total mostraron la presencia de Dp119, así como las isoformas de Dp71 (Dp71d y Dp71 Δ_{110}^m) mientras que las bandas de 52 kDa y 43 kDa son indicativas de β -dístroglicano, 84 kDa de α -dístrobrevina y 58 kDa de α -sintrofina (Figura 11).

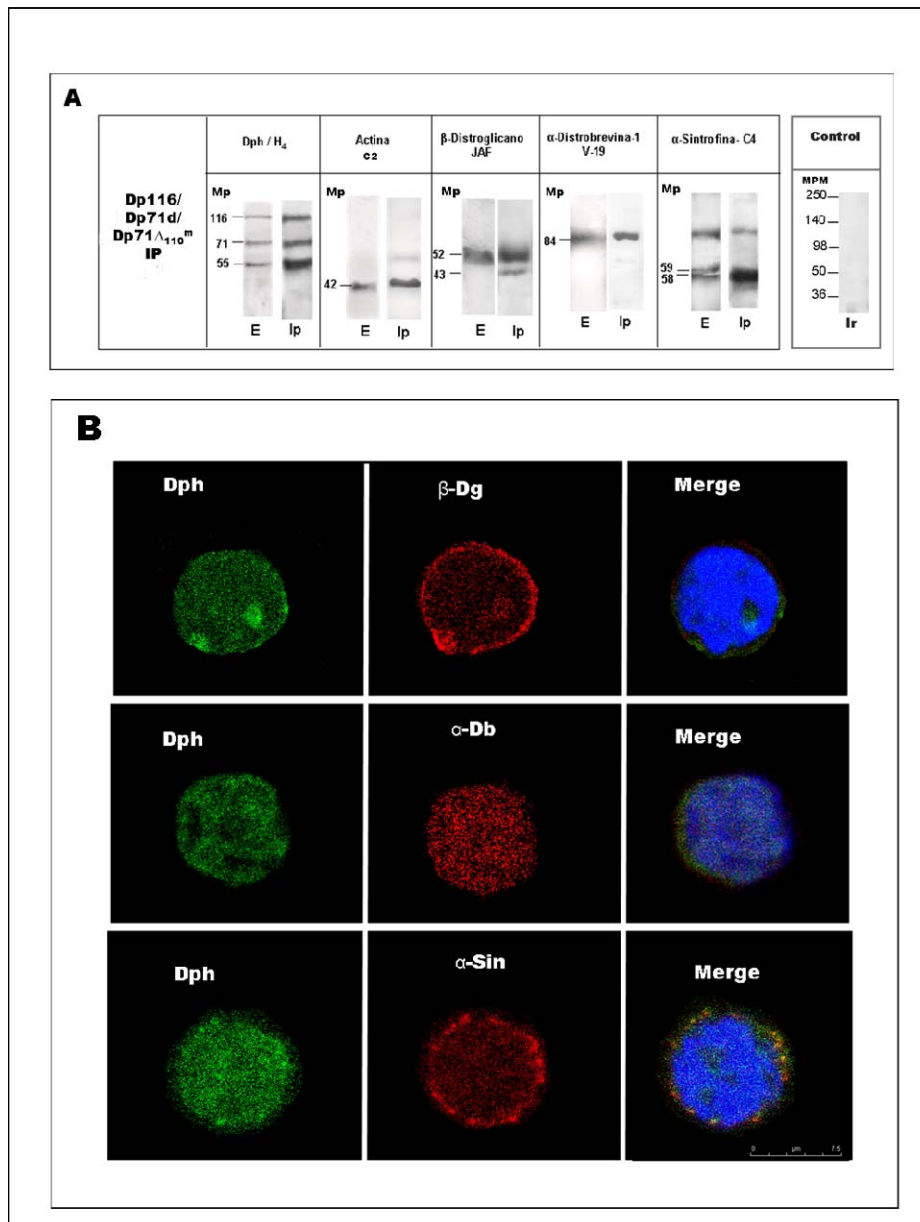


Figura 11: Se confirma la interacción de Dp con Actina filamentosa y las DAPC; en la parte superior, marcado con la letra **A** podemos observar por ensayos de inmuno precipitación (IP), la existencia de Dp en células CD34⁺ y la relación mantiene con DAP's, al identificar en el carril del inmunoprecipitante (Ip), la presencia de bandas enriquecidas por la presencia de las proteínas formadoras del DAPC. Marcado con la letra E el primer

carril hace referencia a la presencia de distrofina y el DAPC por western blot; en el extremo derecho se observa un carril marcado con Ir (irrelevante) que corresponde al control positivo que corrobora la interacción y especificidad del ensayo. En la imagen **B** (Esc.=7.5µm), es posible identificar la distribución de Dp (verde) en los primeros planos focales y en rojo las proteínas que conforman el DAPC; el tercer corte que corresponde al merge, es posible evidenciar que estas proteínas mantiene no solo cercanía, también co-localizan en lugares estratégicos de la célula con Dp, que esta presente en el citoesqueleto celular.

8. Up400/Up140 co-localiza con β-Dg, α-Db y α-sintrofina en CD34⁺ de SCU.

Para corroborar la interacción del DAPC con utrofinas se realizaron ensayos de inmunoprecipitación e inmunofluorescencia con doble marcaje de anticuerpo primario dirigido a utrofina y DAPs (β-distroglicano, α-distrobrevina y α-sintrofina), con la finalidad de observar si Up400/Up140 al estar presente en las CD34⁺, presenta interacción y co-localización con el DAPC al igual que distrofina. En las imágenes obtenidas por microscopia confocal, se observó que Up400/Up140 se encuentra distribuido en la región del citoplasma en un patrón similar a lo observado por las DAPs aunque con una baja interacción de las proteínas en cuestión, sin embargo, es posible concluir que β-Dg, α-Db y α-sintrofina, interactúan con Up400/Up140 en regiones específicas de la célula. Nuevamente para corroborar la interacción proteína- proteína y su co-localización descrita en el merge, se evaluó por la técnica de inmunoprecipitación la posible asociación de las DAPs con Up400/Up140, revelando la presencia de las proteínas a través de la técnica de Wb en extractos totales (E) como en los inmunoprecipitados (Ip). El anticuerpo K7 mostró la presencia de las proteínas correspondientes a Up400 y Up140 con peso molecular de 395 kDa y 140 kDa respectivamente. Así mismo se observó la presencia de las DAPs, β-distroglicano con bandas de 52 kDa y 43 kDa; α-distrobrevina y 58 kDa de α-sintrofina (Figura 12).

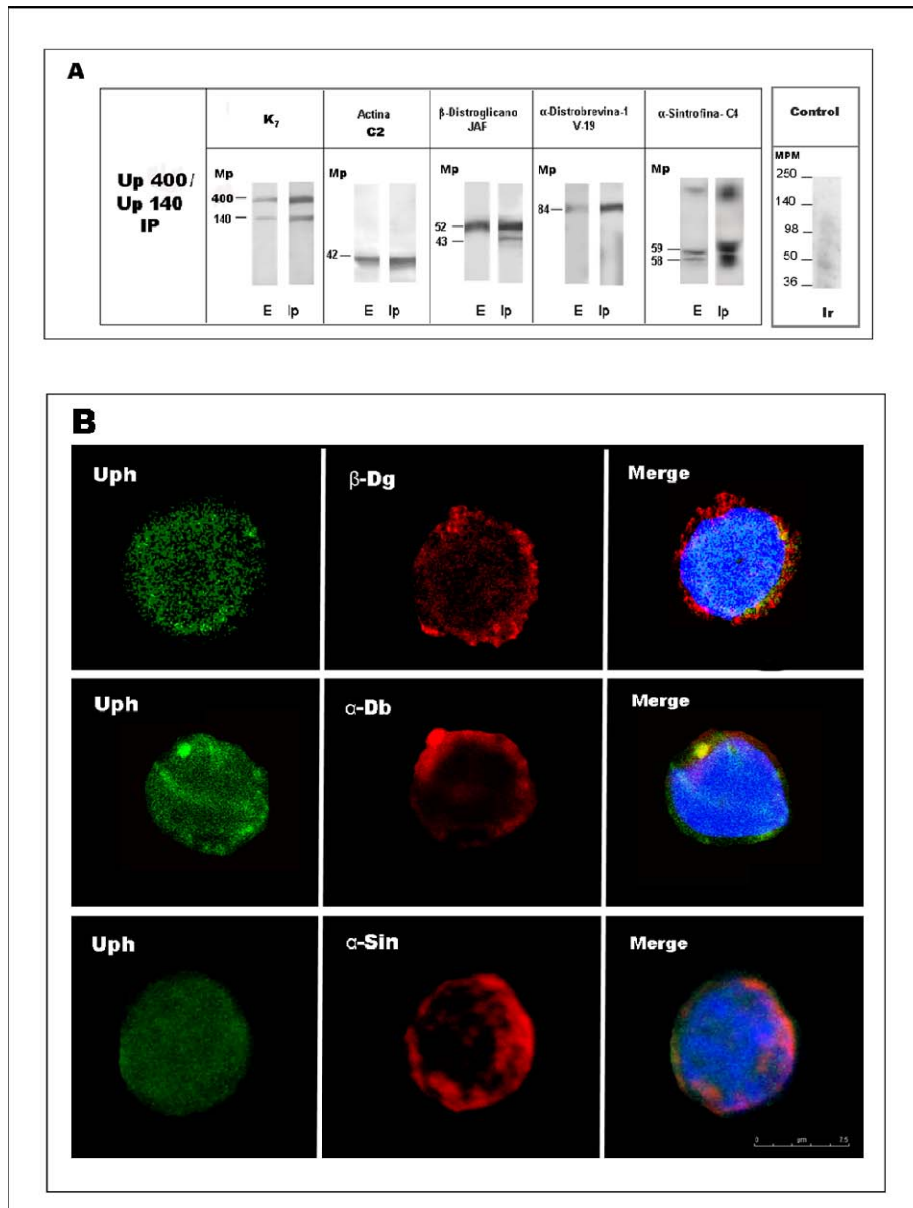


Figura 12: Se confirma la interacción de Up con las DAPC. En **A**, es posible observar por ensayos de inmunoprecipitación (IP), la existencia de la proteína Up y el DAPC en los carriles marcados con la letra E en CD34⁺ y es posible confirmar la relación existente de Up con el DAPC carril Ip; En el último bloque marcado con la letra Ir, se puede observar el control positivo que corrobora dicha interacción, y la relación que estas mantiene con

al ser identificadas en el carril del inmunoprecipitado la presencia de bandas enriquecidas por la interacción con Up. En la imagen **B** (Esc.=7.5µm), se identifica su distribución topográfica por microscopía confocal; en la cual en verde; es posible identificar la distribución de Up, teñida con FITC; en rojo teñidos con TRICT se identifican las proteínas que conforman el DAPC. En el tercer corte correspondiente al merge, se evidencia la co-localización e interacción del DAPC con Up haciendo evidente no solo la cercanía, si no la interacción que estas mantienen con utrofina aunque en menor proporción con respecto a la relación que se observa en la figura anterior con Dp.

9. Comparación de la distribución topográfica de Dp en CD34⁺ humanas de SCU y LMC.

El patrón de distribución analizado para distrofinas, utrofinas y proteínas asociadas a distrofina ha sido retomado, para poder hacer un comparativo de las diferencias topográficas existentes entre células normales y células leucémicas.

Debido a la baja cantidad de células leucémicas, se recurrió únicamente al análisis por inmunofluorescencia, mediante microscopía confocal (Figura 13A) utilizando como control y referencia células CD34⁺ de SCU y como objeto de estudio, las CD34⁺ leucémicas; procedentes de pacientes con diagnóstico reciente de LMC. Para ambos casos, se utilizaron las mismas condiciones y técnicas así como los siguientes anticuerpos: anticuerpo H4, K7 y anticuerpos dirigidos contra α -dístroglicano, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y α -sintrofina ; todos ellos revelados con un anticuerpo secundario marcado con FITC y falacidina marcada con TRITC para ubicar actina filamentosa; los núcleos fueron contrastados con DAPI en todos los casos. Para facilitar el análisis y comparación de las figuras obtenidas por microscopía confocal, se han montado células tallo hematopoyéticas sanas de SCU mientras que en la parte inferior podemos ver las imágenes correspondiente a las células troncales leucémicas.

Dp71d se observa una distribución homogénea y disminuida en las células

leucémicas mientras que en el merge la co-localización es pobre. El núcleo podemos observar la existencia de bordes irregulares en la membrana nuclear y la presencia de abundantes nucléolos, los cuales no son identificados en las células sanas (Figura 13 A).

10. Análisis de Utrofina en células tallo de sangre de cordón umbilical y células de médula ósea de pacientes con LMC.

La distribución que mantiene Up400/Up140 es escasa y su interacción con los filamentos de actina aparentemente disminuye en comparación a las células sanas. En relación al núcleo se observan la presencia de nucléolos (Figura 13 B).

11. Comparación y análisis de α -dístroglicano en células de SCU y Células Leucémicas.

Para el análisis de α -dístroglicano por microscopia confocal; se utilizó como anticuerpo primario, anti- α -Dg; y fue revelado con anticuerpo secundario FITC; nuevamente para actina filamentosa se utilizó falacidina y DAPI para núcleos. α -Dg se puede observar con un patrón de distribución abundante en toda la extensión de la membrana extracelular; es interesante observar que en ciertas regiones la concentración pareciera ser mayor. Debido a que se trata de una proteína membranal, no interactúa con actina la cual mantiene un patrón de distribución homogéneo en toda la célula.

En células de LMC la presencia de α -Dg se observa aparentemente en menor proporción en comparación a las células control; aunque se mantiene el patrón de distribución de α -Dg en toda la periferia de la membrana, siendo evidente solo en

algunas zonas donde prevalece, mientras que actina filamentosa no mantiene un patrón uniforme de distribución. El núcleo tiene la presencia de nucléolos (Figura 13 C).

12. Comparación de β -Dg células tallo humanas de SCU y LMC.

Mediante microscopia confocal, fue posible apreciar el patrón de distribución y ubicación de β -Dg tanto en células control como en células leucémicas; para realizar esto se marcó con FITC el anticuerpo anti β -Dg, falacidina para actina filamentosa y para núcleo DAPI. En la célula control se pudo observar la ubicación de β -Dg principalmente en la región sub-membranal y algunas regiones de la membrana nuclear. En cuanto a la imagen correspondiente al patrón de distribución dado por células leucémicas; es importante destacar que la distribución de β -Dg, se observa modificada casi en su totalidad ya que en la región próxima a la membrana celular esta casi ausente; invirtiendo la relación de concentración de esta pues durante el merge puede observarse que ahora la mayor concentración esta ubicada principalmente en el núcleo (Figura 13 D).

13. Identificación y comparación de α -sintrofina en células tallo humanas de sangre de cordón umbilical y de LMC.

Durante el análisis de células de SCU se pudo observar que α -sintrofina cuenta con un patrón de distribución limitado casi en su totalidad a la región sub-membranal a manera de pequeños cúmulos tenues, que se concentran solo en ciertas regiones de la membrana (Figura 13 F); durante el merge se presenta una aparente asociación con los filamentos de actina y su probable interacción y co-

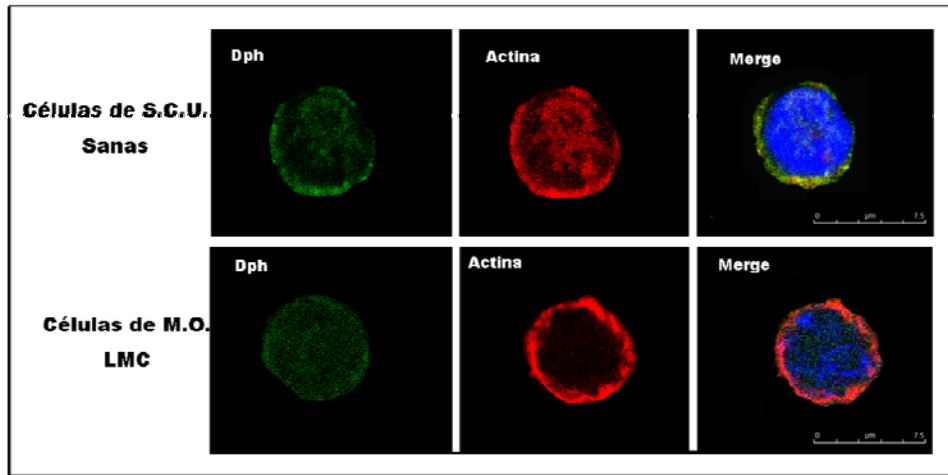
localización por debajo de la membrana.

En el caso de las células de LMC es notoria la distribución de α -sintrofina ; en una de las regiones de la célula; dando una franca impresión de polarización; así mismo la intensidad de la fluorescencia es sugerente de que existe una mayor concentración de esta proteína en relación con las células sanas en las que el patrón de distribución es menor y se encuentra en toda la superficie de la membrana sin dar la impresión de una posible polarización. Al evaluar la sobreposición de los planos celulares (merge); podemos observar una interacción entre α -sintrofina y actina (Figura 13 F).

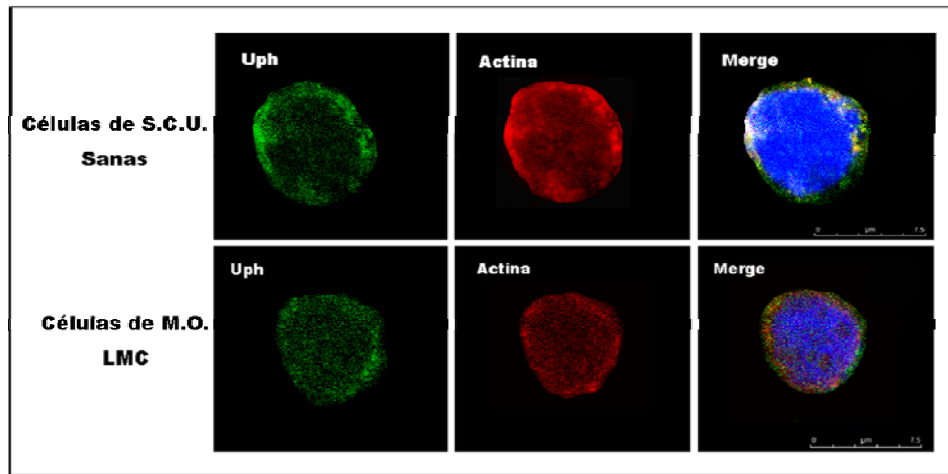
14. α -Db se observa en baja concentración en CD34⁺ de SCU.

α -Db, fue analizada por microscopia confocal utilizando un anticuerpo anti α -Db; el cual fue incubado con anticuerpo secundario FITC y para actina filamentosa una vez mas se utilizó falacidina y DAPI para el núcleo. En células tallo hematopoyéticas de SCU; la presencia de α -Db es observada por el patrón de fluorescencia de FITC, que permite ubicar su localización citoplasmática pero también nuclear; aunque se encuentra en una baja concentración es posible observar no solo la ubicación próxima que mantiene en la membrana celular; también es evidente, que existe co-localización e interacción con actina filamentosa. En el caso de las células de LMC, la distribución de α -Db sugiere un aumento de esta proteína con respecto a la concentración que se describió previamente; aunque la ubicación sigue siendo citoplasmática y próxima a la membrana, así como la ausencia completa en el núcleo el cual presenta nucléolos (Figura 13 E).

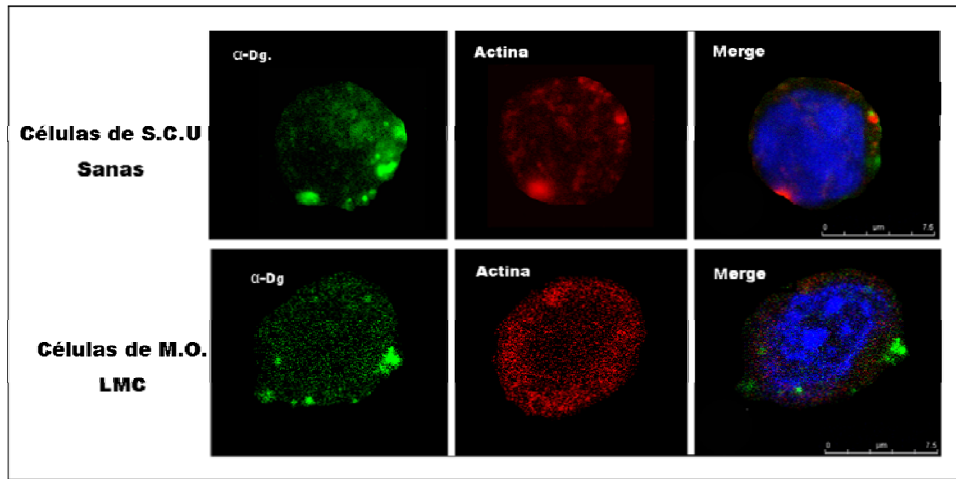
A



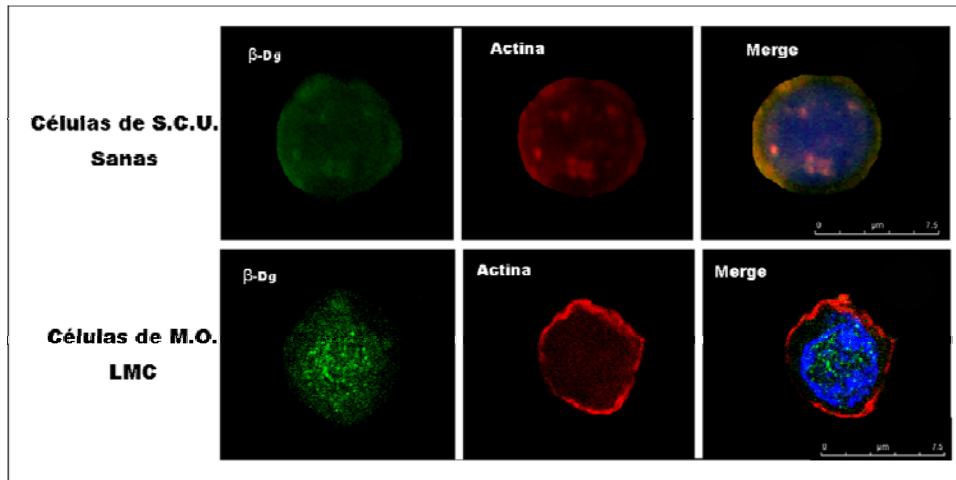
B



C



D



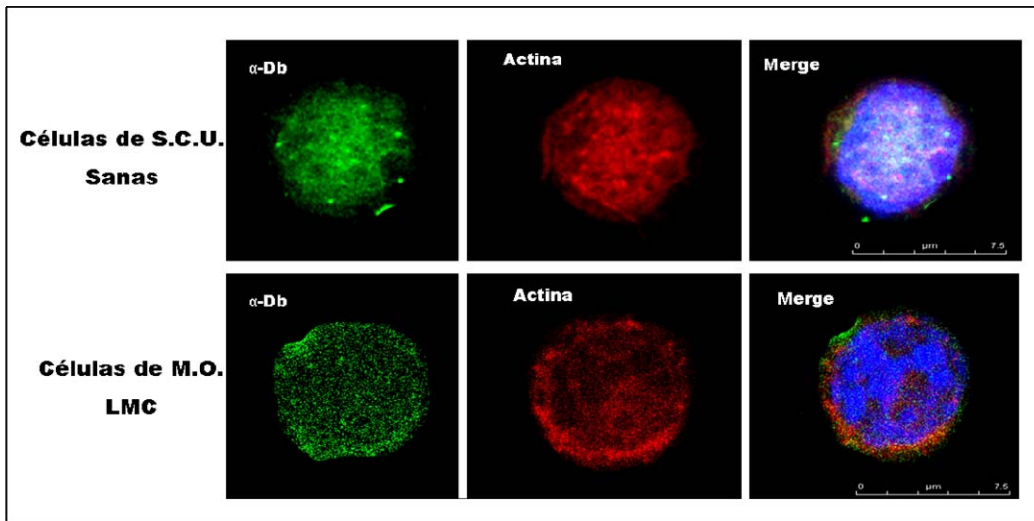
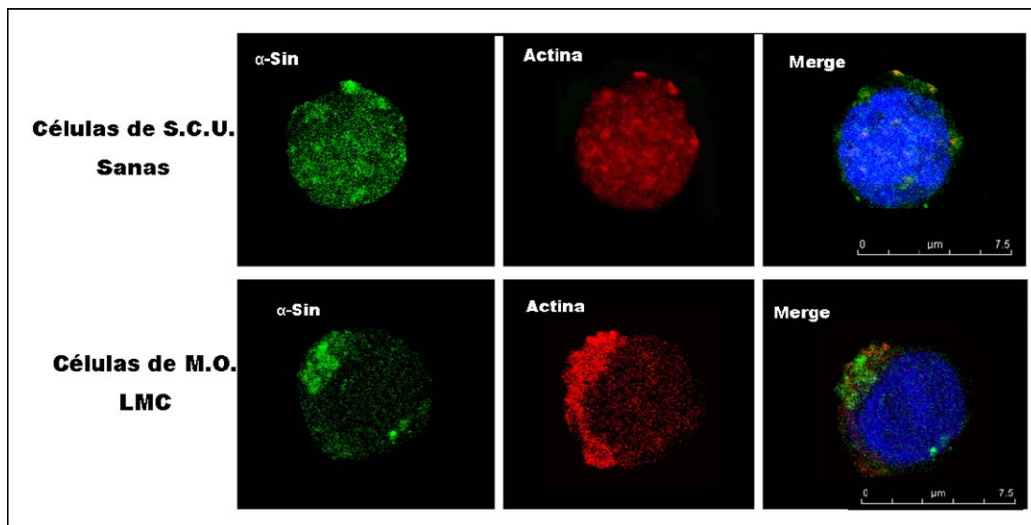
E**F**

Figura 13: Comparación de la Distribución topográfica en $CD34^+$ de SCU y $CD34^+$ de LMC (Esc.=7.5 μ m). Por ensayos de inmunofluorescencia, una vez caracterizadas Dp (A), Up (B) y el DAPC, α -dístroglicano (C), β -dístroglicano (D); α -dístrobrevina (α -Db) (E), α -sintrofina (α -Sin) (F); en células de cordón umbilical, se recurrió a la comparación de la distribución topográfica de las mismas proteínas en células de pacientes de LMC; en

todos los casos la distribución y la cantidad de dichas proteínas fue modificada en las células leucémicas.

15.- Interacción de Distrofina y su proteína homóloga Utrofina con el DAPC en LMC

Una vez realizado el análisis por microscopía confocal de la interacción de Dp, Up, y el DAPC con actina filamentosa y habiendo encontrado cambios en la distribución topográfica descrita en el grupo control; se recurrió al análisis de la relación e interacción que mantienen Dp y Up con el DAPC, encontrando los siguientes datos de interés:

Si bien se pudo observar el cambio de distribución de las proteínas en los pacientes con LMC, también fue posible encontrar que la interacción entre estas se ve alterada no solo por el cambio de su ubicación sino también por la disminución de Dp en relación con el DAPC en las células de SCU (figura 14 y 15). En las imágenes tomadas por microscopía confocal, no solo podemos observar nuevamente que se trata de una célula que presenta un aumento de nucléolos, también es posible ver que dentro de estos cambios la interacción de Dg con Dp esta francamente disminuida.

Por el contrario se observa que Up aparentemente aumenta su concentración y modifica su patrón de distribución al igual que α -distrobrevina y α -sintrofina, en las que podrían sugerir un aumento de estas proteínas y su co-localización.

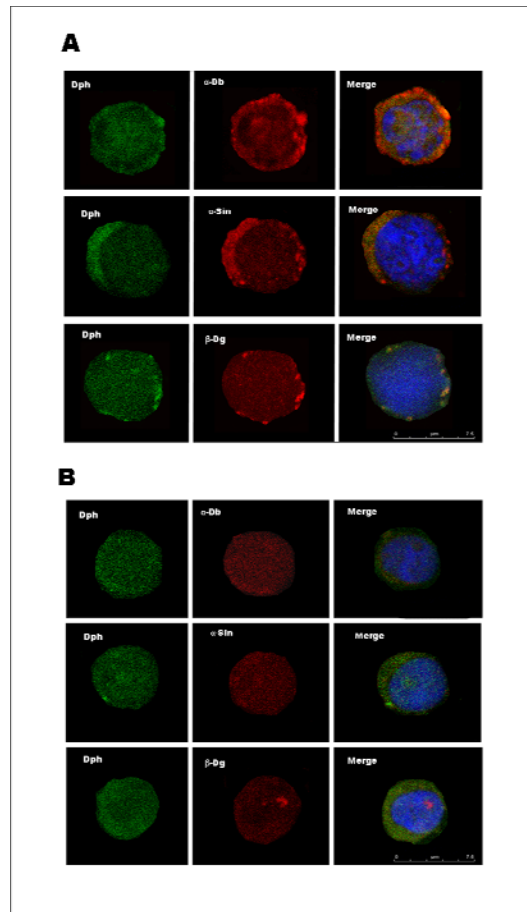


Figura 14: Relación que mantiene Distrofina con el DAPC en células LMC; (Esc.=7.5 μ m). En la figura A, es posible identificar en el primer plano focal la distribución de Dp en toda la superficie celular; cabe destacar que en los 3 casos se observa que la proteína se concentra en ciertas regiones de la célula; en el segundo plano focal, correspondiente al DAPC α -sintrofina (α -Sin), α -Distrobrevina (α -Db) y β -distroglicano (β -Dg). En los 3 casos aun se mantiene la interacción del DAPC con Dp pero la señal de intensidad aparentemente ha disminuido. En la figura B podemos observar la distribución de las células sanas de SCU.

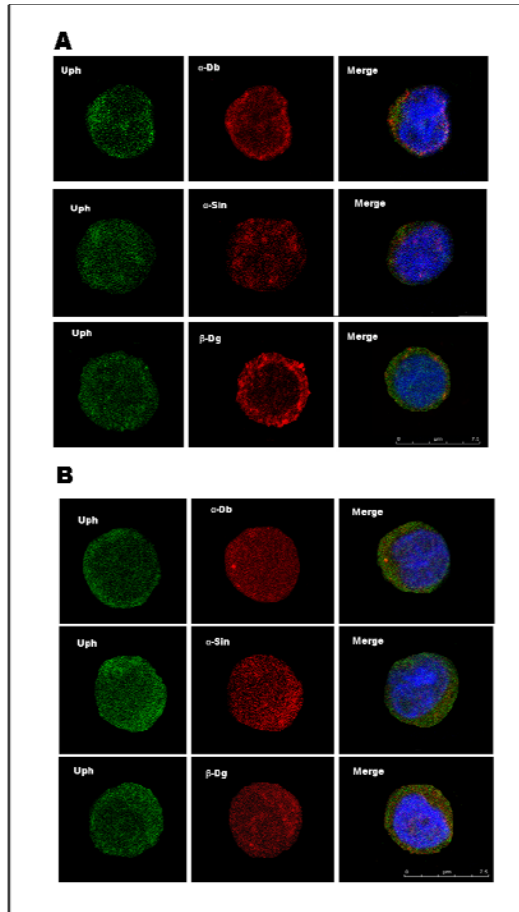


Figura 15: Relación que mantiene utrofina con el DAPC en células de LMC (Esc.=7.5 μ m); en la figura B, se identifica en el primer plano focal la distribución de Up en las imágenes correspondientes al DAPC se observa aumento de intensidad en la señal emitida por α -sintrofina (α -Sin), α -Distrobrevina (α -Db) y β -distroglicano (β -Dg).

16.- Cultivo primario de células CD34⁺

Se realizó un control interno de la morfología de las células CD34⁺ aisladas en SCU, para corroborar la distribución de nuestras proteínas de interés, para lo cual se implemento el cultivo de dichas células en tres pozos, que fueron sometidos a diferentes condiciones en relación a la aplicación de citocinas para su mantenimiento.

Como primer paso se procedió al aislamiento de células CD34⁺ por perlas magnéticas de SCU. Una vez aisladas de la sangre total fueron cultivadas con la finalidad de evaluar su pureza por citometría y corroborar que no existen diferencias en la distribución de las proteínas Dp, Up y el DAPC; al momento de extraer las células CD34⁺ directas de SCU.

Las imágenes analizadas mostraron una distribución muy similar a las obtenidas de cordón umbilical (Figura 17 y 18).

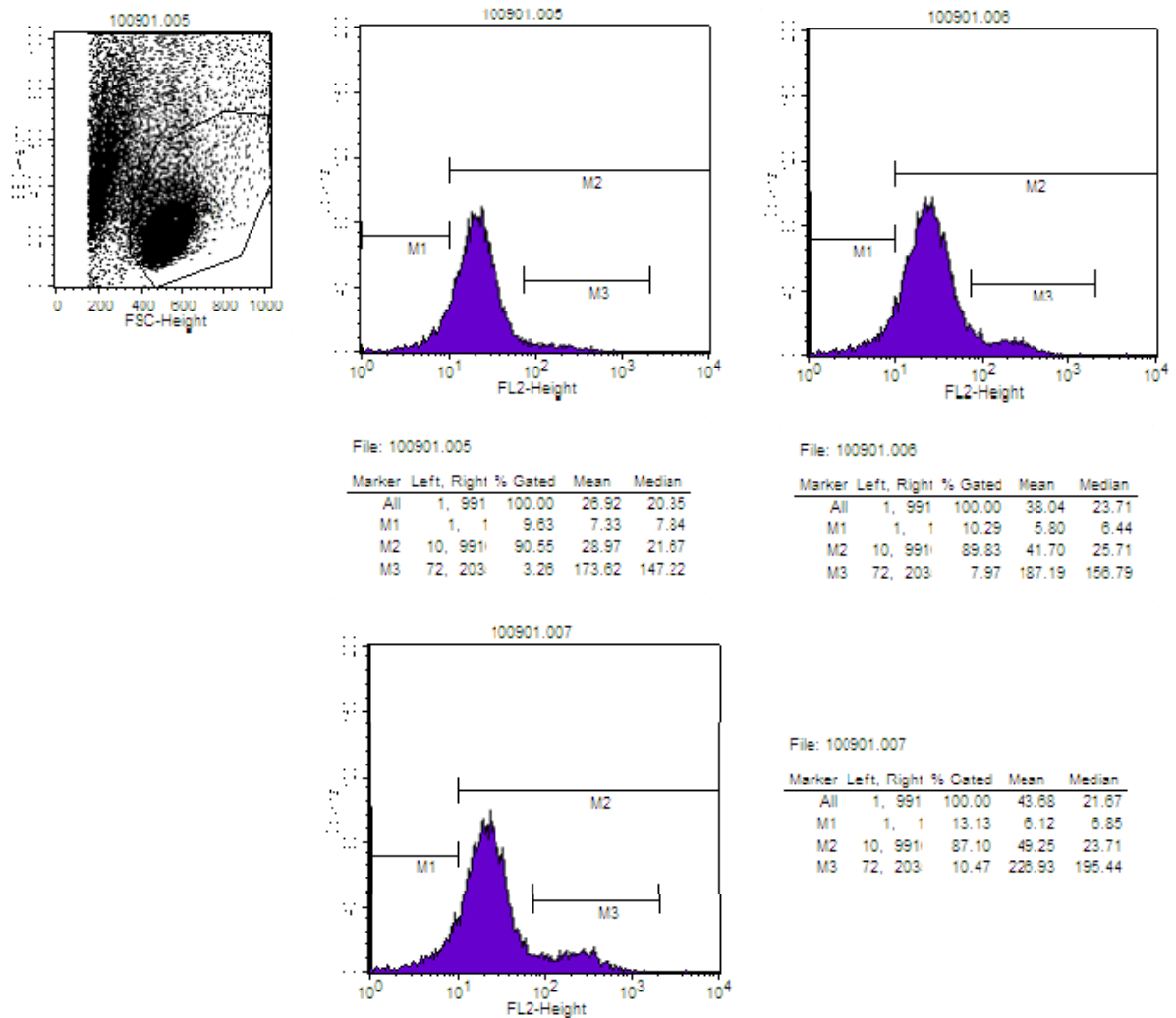


Figura 16: Control interno de Células CD34⁺ de SCU; se montó un cultivo de células CD34⁺ con dos condiciones de citocinas; de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, en la primera figura podemos evaluar la pureza de las células CD34⁺ cultivadas en suero fetal bovino con antibiótico y dos citocinas TPO y FLT₃, evaluándose una pureza de las células de 91%; en el caso dos y tres; se cultivaron de la misma manera y se adicionaron 3 citocinas: TPO, FLT₃ y SCF, encontrándose dos sub poblaciones e ambos casos y una pureza del 87%. Por lo que el cultivo con mayor pureza fue utilizado para corroborar la distribución topográfica de Dp, Up y su relación con el DAPC en células sanas, no leucémicas.

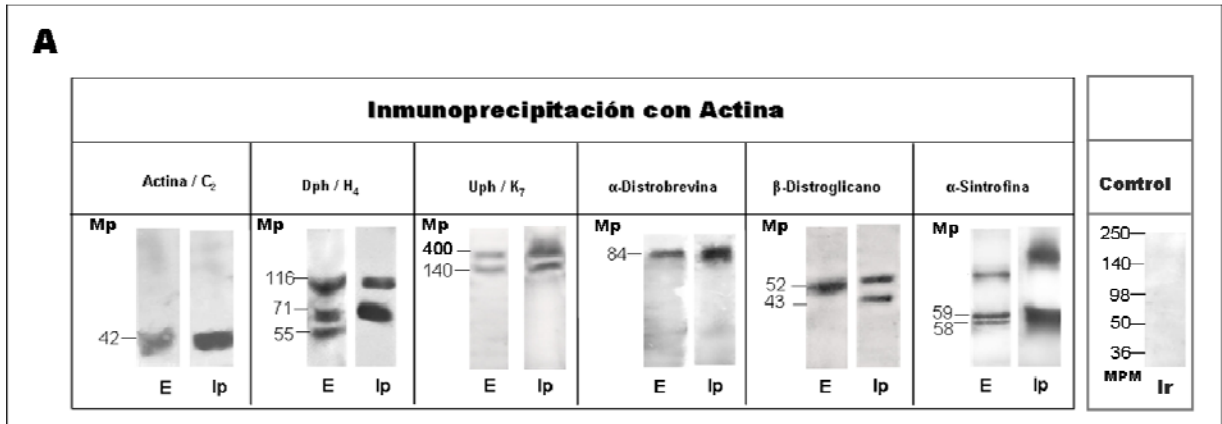


Figura 17: Ensayos de Inmunoprecipitación para comprobar la interacción de Actina con Dp, Up y el DAPC. En la figura **A** es posible identificar por ensayos de Western blot la presencia de Dp, Up y el DAPC en el carril marcado con la letra “E” (que hace referencia a Extracto total de proteína); el segundo carril marcado con las letras “Ip”, corresponde a los inmunoprecipitantes; en los cuales es posible identificar nuestras proteínas de interés enriquecidas por la interacción y relación que mantienen con actina filamentosa en el citoesqueleto celular. En el último bloque marcado con “Ir” (irrelevante), es posible identificar el control positivo utilizado para la prueba.

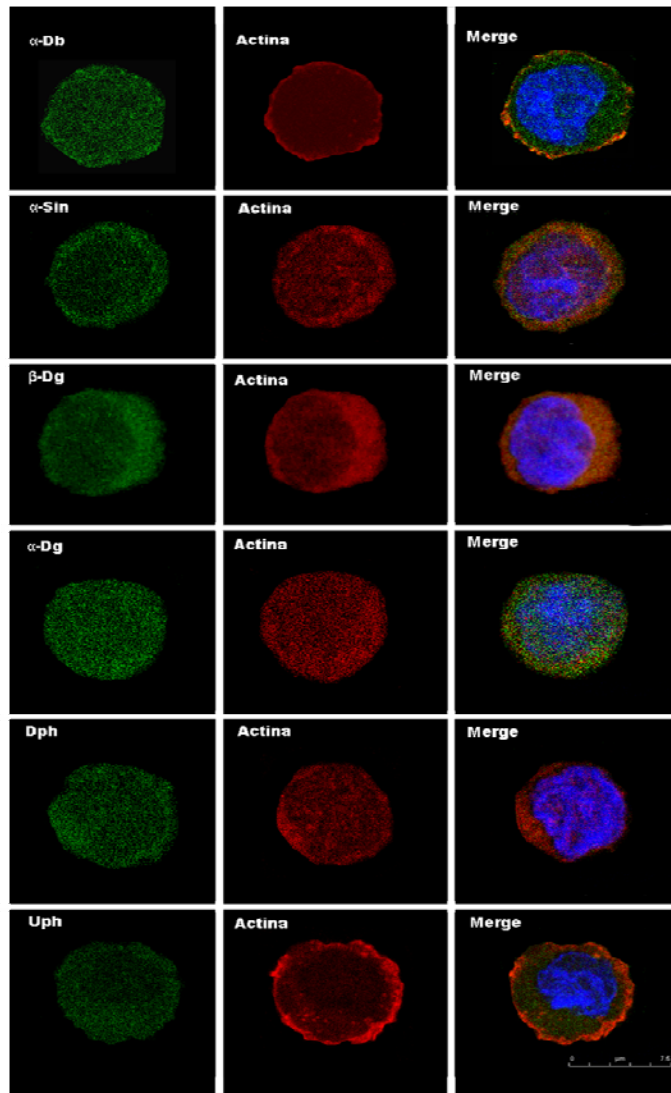


Figura 18: Figura B (Esc.=7.5 μ m, de arriba hacia abajo), se identifica en la primera columna con FITC la ubicación de Dp, Up y DAP's de la distribución topográfica respectivamente. Con TRICT falacidina, en la columna de en medio puede observarse la distribución de los filamentos de actina dentro del citoesqueleto; en estos casos es posible ver el abundante contenido de actina y en la imagen correspondiente al merge la distribución sub-membranal de las DAP's y su ubicación y proximidad de interacción dentro de la célula, por lo que se puede concluir con el merge que estas proteínas co-localizan, principalmente en la sub-membrana en todos los casos (excepto en α - Dg), lo cual es corroborado por el ensayo de IP con actina (Figura A); como

anteriormente se describió en células de SCU.

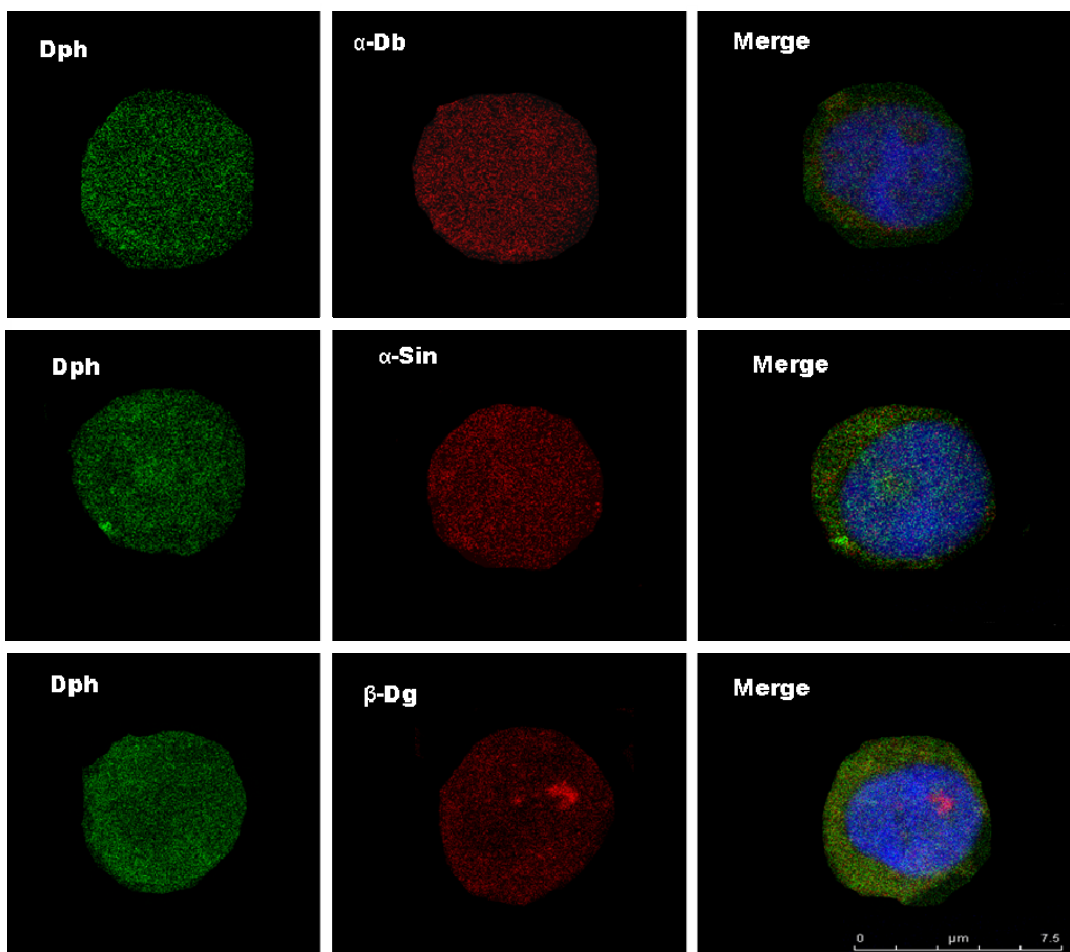


Figura 19: Interacción de Distrofina con el DAPC en células CD34⁺ cultivadas a partir de SCU: de arriba hacia abajo, (Esc.=7.5μm) podemos observar la distribución de Dp en el citoesqueleto celular teñido con FITC; teñido con TRICT podemos observa la distribución del DAPC, el cual es evidente que mantiene el mismo patrón de distribución que presentan las CD34⁺ de SCU; al observar el merge de α-sintrofina (α-Sin), α-Distrobrevina (α-Db) y β-distroglicano (β-Dg) es evidente que la co-localización con Dp se encuentra presente; manteniendo el mismo patrón de señal que las células de SCU anteriormente analizadas.

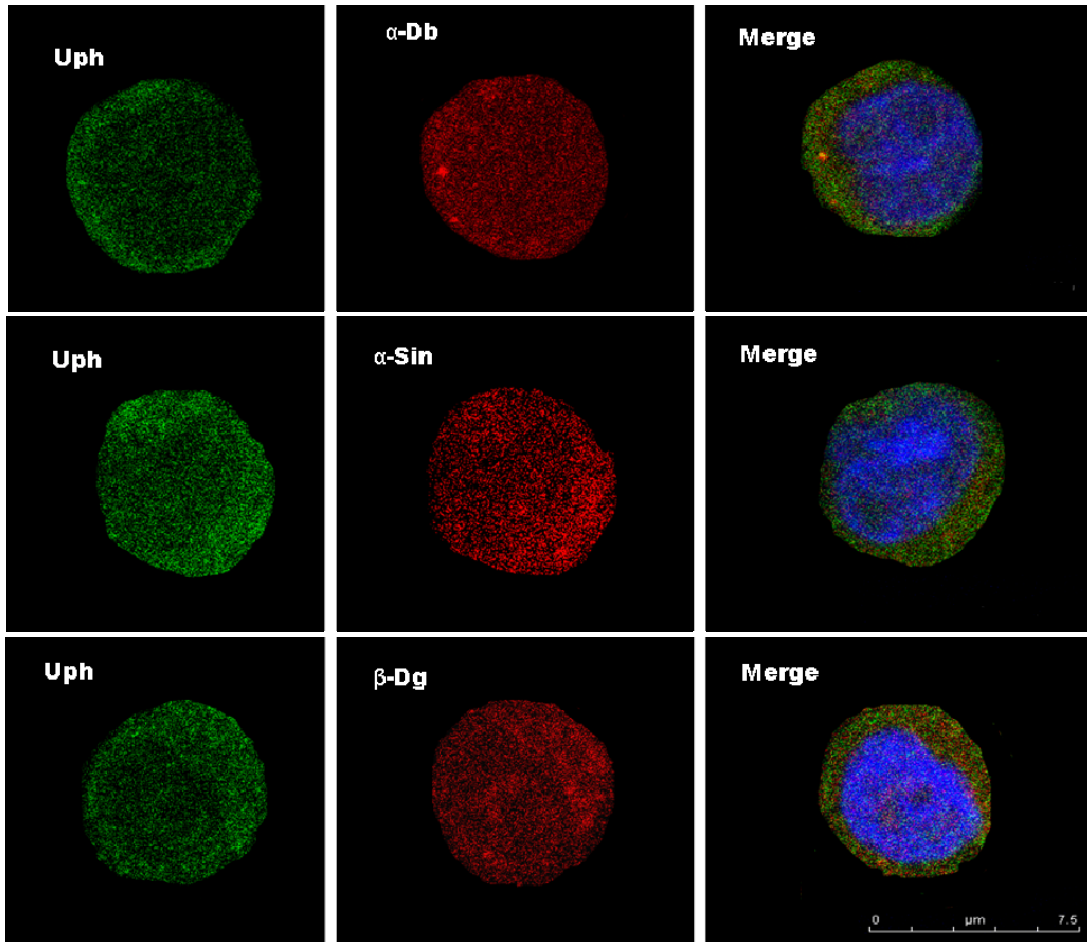


Figura 20: Interacción de Up con el DAPC en células cultivadas de SCU: (Esc.=7.5 μ m) de arriba hacia abajo), teñido con FITC, podemos observar la distribución de Up en el citoesqueleto celular, así como el mantenimiento del patrón de distribución anteriormente observado en SCU, de la misma manera teñido con TRICT podemos la distribución que presenta el DAPC; el cual mantiene el mismo orden topográfico descrito anteriormente, al momento del merge se corrobora nuevamente que se mantiene el mismo patrón de interacción de Up con el DAPC en células sanas y esto mismo, sugiere que las células leucémicas sufren cambios de co-localización con las proteínas presentes en citoesqueleto.

DISCUSIÓN

Las Células Madre Hematopoyéticas (CMH) también conocidas como células CD34⁺, son consideradas como células adultas multipotenciales que conservan la capacidad de auto-renovación y diferenciación únicamente a tejido hematopoyético (4, 39, 63,15). Para que se puedan desarrollar estas propiedades el nicho celular quien aporta los componentes celulares (células del estroma, adipocitos, fibroblastos, endotelio y osteocitos) así como no celulares (colágeno, fibronectina, vitronectina, proteoglicanos, laminina). Para que los progenitores hematopoyéticos puedan alcanzar su maduración y diferenciación, es necesaria su adhesión a la matriz extracelular. Esta estructura constituye el medio homeostático, nutricional y metabólico, al permitir la comunicación celular, la interacción de los distintos intermediarios de los procesos de señalización, activación intracelular y extracelular regulando la actuación genética, el funcionamiento celular e inclusive los procesos de transformación maligna (30, 58, 61). En el caso de la leucemia mieloide crónica (LMC), la alteración de la adhesión celular y la participación de las biomoléculas celulares juegan un papel crucial en el comportamiento celular y la progresión de la enfermedad. No obstante que los posibles efectores de las deficiencias en la adhesión de las células CD34⁺ de LMC aún no han sido identificadas (30, 31); se ha demostrado que existen cambios en la expresión de la integrina β -1 así como de la cinasa de adhesión focal; lo cual sugiere también cambios estructurales en la célula, que afectan al citoesqueleto y a la membrana celular. Alfa y beta distroglicano son componentes del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) que participan en el adecuado funcionamiento celular a través de la interacción de la subunidad alfa y la matriz extracelular por medio de laminina-2 (5). Por otro lado

se sabe que Dg, se expresa en muchos otros tipos celulares y desempeña funciones implicadas en el desarrollo, estructura, función y morfogénesis (7, 36, 44). Por consiguiente la alteración o la ausencia de Dg se han asociado a diversas fallas de la arquitectura celular, lo cual indica que el Dg tiene una función no solo a nivel del desarrollo sino también en el mantenimiento de tejidos adultos; así mismo participa en el ensamblaje, la adhesión celular y procesos de señalización. Por lo tanto, su ausencia o anomalías han sido asociadas con severos desordenes congénitos y progresión del cáncer brindando pistas sobre la patogénesis de enfermedades complejas (5,22,28).

Con la finalidad de dilucidar la importancia y existencia de estos complejos en etapas tempranas del desarrollo celular; además de evidenciar su importancia y la posible participación en la progresión del cáncer (durante la progresión de LMC); se realizaron ensayos en células tallo hematopoyéticas de SCU y su correspondiente comparación con células tallo hematopoyéticas pertenecientes a pacientes con LMC. El análisis de las DAPC por microscopía confocal en las células CD34+ sanas y su asociación cercana con filamentos de actina, corroborado por el ensayo de inmunoprecipitación sugiere su participación como un posible andamiaje. Se sabe que dentro de las proteínas blanco de la proteína cinasa sintetizada por el cromosoma Filadelfia están la cinasa de adhesión focal, talina y paxilina (6, 39, 45, 51, 61), por lo que las notables diferencias en la distribución de los DAPC constituidos por isoformas de Dp71, por Up400/Up140 así como los filamentos de actina en las células provenientes de pacientes con LMC, apoyarían la participación de los complejos en la estabilidad y estructura del citoesqueleto.

La identificación del patrón de expresión del complejo de proteínas asociado a

distrofina se realizó por ensayos de Western-blot, empleando como control positivo extractos de células de músculo de ratón C2C12. Dicho patrón fue muy similar excepto para β -dístroglicano que se identificó con una banda de 52kDa, un peso mayor al esperado el cual podría estar presentando algún cambio post-traducciona l en el que se puede incluir la fosforilación.

En las células CD34+ de LMC, se observó una aparente disminución de las proteínas que constituyen de los complejos de distrofina y utrofina así como una mayor distribución intranuclear lo que podría sugerir que β -dístroglicano podría participar como un componente de la matriz nuclear regulando la expresión génica y por tanto de la patología.

Así mismo en las células de LMC es muy evidente la presencia de nucléolos en los que se localizan proteínas de los complejos no observadas en las células no leucémicas de SCU y del cultivo primario control, lo cual refleja la alta actividad de síntesis proteica y metabólica por parte de las células leucémicas.

Los resultados mostrados en el presente trabajo y las respectivas diferencias en los patrones de expresión de las proteínas estudiadas en relación con las células sanas deberán ser corroborados mediante técnicas de biología molecular. Adicionalmente y de acuerdo con reportes realizados en neoplasias de tejido sólido, el grado de glicosilación de los dístroglicanos podría estar afectado y ser indicativo de factor diagnóstico y pronóstico de las LMC.

CONCLUSIONES

1. Se corroboró la existencia del complejo asociado a distrofinas y utrofinas constituido por Dp71d y Up400/Up140 respectivamente.
2. Dp71d~DAPC y Up400/Up140~DAPC se asocian con funciones de andamiaje y estructura en células CD34+.
3. Las diferencias en la distribución de los componentes de los complejos proteicos asociados en las células CD34+ de pacientes con leucemia mieloide crónica podrían estar relacionados con la patología de la enfermedad.

PERSPECTIVAS

1. Caracterizar bioquímicamente las proteínas asociadas a distrofina y corroborar la presencia de los complejos en células de LMC.
2. Caracterizar los patrones de glicosilación de los distroglicanos en células CD34+ sanas y de leucemia mieloide crónica.
3. Corroborar la presencia de los complejos asociados a distrofina en los núcleos de las células CD34+ de leucemia mieloide crónica y su posible papel funcional, al provocar la inhibición de distroglicanos.

ÉTICA Y BIOSEGURIDAD

El presente estudio cumple con las condiciones de estudio en seres humanos de acuerdo a la declaración de Helsinki que se consigna en la ley general de salud, la NOM-017-SSA2-1994 para la vigilancia epidemiológica y la OMS; así como el de las buenas prácticas clínicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anjos A.F, Bonnet D. "Flexible and dynamic organization of bone marrow stromal compartment". *British Journal Haematology*, (2007) 139, 373-384.
2. Aparicio J. M, "Distrofias musculares y síndromes Miotónicos" Artículo de revisión; *Revista del Hospital Ramón y Cajal*. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid. 2007
3. Arora A, Scholar E. M, "Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy" *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315:3, 971–979, 2005
4. Austin RC, et.al. "Identificación of Dp71 isoforms in the platelet membrane skeleton. Integrin-induced change in detergent-insolubility and cleavage by calpain in agregatin platelets" *J Biol Chem* 2002; 277:47106-13 (PubMed 12370193).
5. Bhatia M. "Hematopoyetic development from Human Embryonic Stem Cells" *Blood American Society of Hematology* 2007, pp 11-15.
6. Blake D, Weir A, et.al. "Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related proteins in Muscule" *Physiol Rev.* 82, 4:2002. pp 291-317.
7. Blum W, Macucci G. "New approaches in acute myeloid leukemia" *Best*

Practice & research Clinical Haematology. Vol. 21 No1. pp 29-41 2008.

8. Bozzi M, Morlacchi S, et.al. "Functional diversity of dystroglycan" Matrix Biology 28 (2009) 179-187.
9. Buzzai M, Litch J. "New molecular concepts and targets in acute myeloid leukemia". Current Opinion In Hematology 2008, 15:82-87. Lippincott Williams & Wilkins.
10. Chacón B, Cisneros B; et.al. "Characterization Q1 of an importin α/β -Recognized Nuclear Localization Signal in β -Dystroglycan" JBC-09-0322.R2(22581)
11. Cerecedo D, et.al. "Platelet adhesion: structural and functional diversity of short dystrophin and utrophin in the formation of dystrophin-associated-protein complexes related to actin dynamics. Thromb Haemost Rev. 2005-12; 94 (6); 1203-1212.
12. Cerecedo D, Cisneros B, Galván I. " β -Dystroglycan modulates the interplay between actin and microtubules in human-adhered platelets" British Journal of Haematology, 141, 517–528 13 March 2008.
13. Cerecedo D, Mondragón R. et.al. "Role of dystrophins and utrophins in platelet adhesion process British Journal of Haematology, 134, 83–91.
14. Cerecedo D, Mondragón R, Candelario A. "Utrophins compensate for Dp71

absence in mdx3cv in adhered platelets” Blood Coagulation and Fibrinolysis, 2008 19:39–47

15. Cerecedo D; Cisneros B; Gómez P; Galván I. “Distribution of dystrophin- and utrophin-associated protein complexes during activation of human neutrophils”. Experimental hematology 2010; 38(8):618-628.e3.
16. Chasis J.A, Mohandas N. “Erythoblastic islands: niches for erythropoiesis” Blood American Society of Hematology” 2008 112: 470- 478.
<http://bloodjournal.hematology.org>
17. Cortes J, Cardama A. “Molecular biology of bcr-abl1 positive chronic myeloid leukemia” Blood American Society of Hematology. 2009 113: 1619-1630.
18. Cortes W, Faderl S, Garcia M.G. et.al. “Imatinib mesylate dose escalation is associated with durable responses in patients with chronic myeloid leukemia after cytogenetic failure on standard-dose imatinib therapy”. 2009 113: 2154-2160.
19. Dávila R.M, Cerda F.R. “Alteraciones cromosómicas secundarias en pacientes con leucemia mieloide crónica, en un hospital de referencia del noreste de México” Gac Méd Méx 140:6,2004.
20. Eliasson P, Jönsson I. “The Hematopoietic Stem Cell Niche: Low in Oxygen but a Nice Place to be” Journal of Cellular Physiology 222: 17–22, 2010.

21. Ervasti, Jame, Leveille, Campbell. "Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix". *Nature* 355 (20). 696-702. 1992
22. Faderl S, Talpaz M, "The Biology of Chronic Myeloid Leukemia" *The New England Journal of Medicine*. 8:18 2009; 341- 5, pp164-171.
23. Fuentes M, Rodriguez M, Cisneros B. et.al. "Localización de la distrofina y las proteínas asociadas a la distrofina en el núcleo de las células musculares C2C12". Departamento de Genética. *Exp Cell Res*, 2006.
24. Hewitt J, "Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease" *Biochimica et Biophysica Acta* 1792 (2009) 853–861. www.elsevier.com
25. Higginson J.R, Winder J. "targeting of dystroglycan to the cleavage furrow and midbody in cytokinesis". *IJB CB* 40 (2008)892-900.
26. Huang X, Cho S, Spangrude G-J, "Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal". *Nature Publishing Group* 2007. 14, 1851–1859.
27. Ibraghimov B. Ervasti, James M, Campbell K. et.al. "Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix". *Nature* 355 (20). 696-702.
28. Ilsey JL, Sudol M, Winder J. "The interaction of dystrophin with B-

Dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation” Cellular Signaling 13:2001, 625-632.

29. Iwasaki H, Akashi K. “Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis” Oncogene 2007:26, 6687–6696
30. Kantarjian M, Giles F, et.al “Nilotinib, a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase resistance and intolerance chronic myelogenous Leukemia in chronic phase following imatinib inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome positive” Blood American Society of Hematology 08-22-2007 110: 3540-3546.
31. Kasper G, Glasser J, et.al. “Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior” Stem Cells 2007; 25: 1985-1994. [wwwStemCells.com](http://www.StemCells.com)
32. Kekarainen T, Mannelin S, Laine J, Jaatinen T. “Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells” BMC Cell Biology 2006 7:300, 08-01- 2006. www.biomedcentral.com
33. Lane S. Scadden D. “The leukemic stem cells niche: current concepts and therapeutic opportunities” Blood, 06-08-2009 114: 6. www.bloodjournal.org
34. Liu Shi V. “iPS cells: A More Critical Review” Eagle Institute of molecular Medicine, Stem Cells and Development 2008, 17:391-397. www.elsevier.com

35. Marché C.A, Salles M.T, Santamaría M. et.al. "GST-pi expresión in BCR-ABL+ and BCR-ABL cells from CML patients" *Investigación Clínica* 52:3; 06-07-2000 pp 266-274.
36. Mayani et.al. "Invitro biology of human leukemia" *Leukemia Research* 33: 624-637(2009). www.elsevier.com
37. Meza-Espinoza, Gutierrez M. et.al. "Prevalence of the BCR/ABL1 transcripts in Mexican patients with Chronic myelogenous Leukemia" *Investigación Clínica* 59: 5. Sep-Oct, 2007 pp 338-341.
38. Moore C, Winder S "Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs"; *Cell Communication and Signaling* 2010, 8:3 <http://www.biosignaling.com>
39. Morales M, Milone J. et.al. "Banco de Células Progenitoras Hematopoyéticas de Cordon Umbilical" *Investigación Médica Buenos Aires* 2001; 61: 843-848 Artículo Original ISSN 0025-7680.
40. Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, et.al. "Ligand-binding specificities of lamini-binding integrins: A comprehensive survey of laminina-integrin interactions using recombinant $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ and $\alpha 6 \beta 4$ integrins". *Matrix Biology Rev.* 25 (2006) 189- 197. www.elsevier.com
www.sciencedirect.com.

41. Páez G. D, Arévalo R.J. "Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea" Publicaciones en Ciencias Biomédicas ISSN:1794-2470 5:8. Julio-Diciembre 2007:101-212.
42. Pessina A, Bonomi A, Sisto F. "CD45+/CD133+ Positive cells expanded from umbilical cord blood expressing PDX-1 and markers of pluripotency". Cell Biology. 16 Apr 2010. www.sciencedirect.com.
43. Petzer et.al. "Selective expansion of primitive normal hematopoietic cells in cytokine supplemented cultures of purified cells from patients with chronic myeloid leukemia" Blood, vol 90 no 1 July 1997 pp 64-69.
44. Prosper F, Verfaillie C; "Células Madre Adultas: Fuentes, características y perspectivas sobre su uso terapéutico" Universidad de Navarra Pamplona, 2000; 6(11):1229-34.
45. Quintás-Cardama, Cortés J. "Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment" Mayo Foundation for Medical Education and Research Mayo Clin Proc. 2006;81(7):973-988 www.mayoclinicproceedings.com
46. Quintás-Cardama A, Cortés J. "Molecular biology of *bcr-abl1*-positive chronic myeloid leukemia" Blood Journal Review article April, 2009 113:1619-1630; www.bloodjournal.hematologylibrary.org
47. Radich J. "The Biology of CML Blast Crisis" American Society of

Hematology 2007 pp 384- 389. www.sciencedirect.com.

48. Ramirez P, Dipersio J. "Therapy Options in Imatinib Failures" The Oncologist 2008;13:424–434. www.TheOncologist.com

49. Rees M, Lien C, Górecki D, "Dystrobrevins in muscle and non- muscle tissues" Neuromuscular Disorders Rev. 17, 2007 123- 134.
www.elsevier.com

50. Renneville A, Roumier C, Biggio V, et.al. "Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature" Leukemia (2008) 22, 915-931. www.nature.com

51. Restrepo J, Rodríguez Silva H, et.al. "Leucemias" Asociación de Medicina Interna de México / Libro 4 SOLAMI 175-199.

52. Robb L. "Cytokine receptors and Hematopoietic differentiation" Oncogene (2007) 26, 6715-6723. Nature Publishing Group. www.nature.com/onc.

53. Rodríguez M, Cardona A, et.al. "Chronic Myelogenous leucemia in blastic fase: molecular bases and diagnosis Part I. instituto Nacional de Cancerología Bogotá Colombia. Rev Colombiana de Cancerología, 2006;10(4): 257-266.

54. Rodríguez M, Cardona A, et.al. "Chronic Myelogenous leucemia in blastic fase: molecular bases and diagnosis Part II. instituto Nacional de

Cancerología Bogotá Colombia. Rev Colombiana de Cancerología, 2006;10(4): 267- 281.

55. Royuela M, Mornet D, et.al. "Formation of multiple complexes between beta-dystroglycan and dystrophin family products" Journal of Muscle Research and Cell Motility 24: 387–397, 2003.

56. Ruiz S.E, Falcon R,T. et.al. "Seguimiento citogenético y molecular en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica y transplante alogénico de Médula osea". Revista Médica Hospital General de México 66:4, Octubre-Diciembre 2003 pp 198-202.

57. Sagambato A et.al. "Dystroglycan expresión is frequently reduced in Human Breast and Colon cancers and is associated with tumor progresión" www.nature.com

58. Savona M, Talpaz M. "Getting to the stem of chronic myeloid leukemia" Review Nature CANCER vol8, may 2008.

59. Steven W, Lane D, et.al. "The leukemic stem cell niche: current concept and therapeutic opportunities". Blood Journal 2009 114:1150-1157.

60. Shiozawa Y, Havens M, et.al. "The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites" Leukemia 2008. 22:941-950. www.nature.com

61. Van Etten R.A, "Aberrant Cytokine Signaling in Leukemia" *Oncogene* 2007. 26, 6738–6749. Nature Publishing, www.nature.com/onc
62. Vargas A, Pérez G. "Transplante de progenitors hematopoyéticos, ¿Es una terapia inmunológica?" *Revista Alergia de México* 2003. 5:192-7.
63. Wertheim J, Perera S, Hammer D, et.al. "Localization of BCR-ABL to F-actin regulates cell adhesion but does not attenuate CML development". *The American Society of Hematology, Blood*: 15 September 2003. 102: 6.
64. Winder, Steven J. (2001). "The complexities of dystroglycan". *Biochemical Sciences* 26 (2). 118-124. www.elsevier.com
65. Wognum B, "Hematopoyetic Stem Cells" *hematopoietic Stem Cells* 2009. www.stemcell.com