

CÁNCER Y APOPTOSIS

Julio R. Cáceres Cortés

RESUMEN

Muchas enfermedades pueden ser atribuidas a problemas con la apoptosis. Existen enfermedades en las cuales hay una falta de regulación de la apoptosis la cual contribuye a la patogénesis de dicha enfermedad. La progresión de la enfermedad puede involucrar la acumulación de células, como en el cáncer, o la pérdida de ellas por un exceso de apoptosis, como en el SIDA. La identificación de los genes y sus productos responsables de la apoptosis, ha dado lugar al descubrimiento de fármacos algunos de los cuales ya están en protocolos de investigación clínica. El balance entre las proteínas pro- y antiapoptóticas puede determinar el destino de las células. A este respecto, mucho se ha aprendido acerca de estas dos familias de proteínas y se continuará la investigación para revelar nuevas estrategias para combatir las enfermedades.

Palabras Clave:

Título en inglés

ABSTRACT

Many illnesses can be attributed directly to problems with apoptosis, a programmed cell-suicide mechanism. Disorders in which defective regulation of apoptosis contributes to disease pathogenesis or progression can involve either cell accumulation (cancer), in which cell eradication or cell turnover is impaired, or cell loss, in which the cell-suicide programme is inappropriately triggered. Identification of the genes and gene products that are responsible for apoptosis, has laid a foundation for the discovery of drugs, some of which are now undergoing evaluation in human clinical trials. The balance between pro- and antiapoptotic proteins can determine cellular fate. In this regard, much has been learned about these families of proteins, and future studies will provide more exciting discoveries and will continue to reveal new strategies for combating human diseases.

Key Words:

ARTÍCULO RECIBIDO EL XX DE XXXXX DEL 2003 Y ACEPTADO EL XX DE XXXXX DEL 2003.

1. DEFINICIÓN

La apoptosis (del Griego «caída de los pétalos de una flor») o muerte celular programada fue inicialmente definida en la década de los 70¹. Los aspectos moleculares que caracterizan la apoptosis no han sido dilucidados en su totalidad, pero ya ha sido reconocido el papel central que juega en el desarrollo normal del organismo. Este fenómeno se encuentra ampliamente distribuido en los metazoarios. En los organismos multicelulares, la morfología de los tejidos y su función están definidos en última instancia por el papel que juegan numerosos procesos, incluyendo la viabilidad, el crecimiento y la diferenciación celular. Sin embargo, otro proceso muchas veces no tomado muy en cuenta, que es requisito para dar forma y función a los tejidos es la muerte celular. La progresión ordenada del crecimiento del tejido y la diferenciación, necesita de la muerte sistemática y la eliminación

de poblaciones selectas de células de tal manera que nuevas células diferenciadas puedan repoblar el substrato y mantener o iniciar funciones alternativas del tejido². Dicha regulación se hace más evidente durante la embriogénesis, conociéndose por muerte celular programada debido a que ésta ocurre en momentos y sitios específicos durante el desarrollo^{3,4}.

Por otra parte, durante la vida adulta también se llevan acabo estos fenómenos de regulación celular. En ocasiones es conveniente referirse a la apoptosis como muerte celular activa, debido a la síntesis de enzimas que lisan el ADN a diferencia de la muerte por necrosis donde la célula se extingue en forma no regulada en respuesta a estímulos tóxicos. La muerte por necrosis está asociada con el daño a los tejidos y al proceso inflamatorio, mientras que la apoptosis es un proceso inducido por señales y que requiere de la expresión de genes usualmente sin la activación de la respuesta inflamatoria⁵.

2. CARACTERÍSTICAS DE LA APOPTOSIS

Los procesos bioquímicos que se llevan a cabo durante la apoptosis forman parte de una intrincada red de eventos. En el núcleo se encuentran genes que codifican para proteínas encargadas de autodestruir a la célula cuando ésta se ve ante una serie de estímulos exógenos desfavorables para su supervivencia. Las células cuando sufren apoptosis, se reducen de tamaño y su núcleo se condensa pero permanecen impermeables a colorantes como el azul tripano. Luego en el curso de la apoptosis, el núcleo y las células se fragmentan y sus restos son fagocitados por los macrófagos que parecen reconocer nuevas proteínas de superficie. Durante la apoptosis la célula desencadena varios eventos moleculares que tienen como resultado la fragmentación del ADN en sitios internucleosomales. Dichos segmentos se obtienen por la acción de endonucleasas específicas y pueden ser observados por electroforesis sobre un gel de agarosa a intervalos de 200, 400, 600 y más pares de bases. El patrón de degradación internucleosomal del ADN es común a todos los ejemplos reportados de apoptosis, por ejemplo, en los tejidos endocrino-dependientes como el endometrio uterino, las células granulosa, el epitelio prostático y las células mamarias (Tabla 1).

Tejido/Células	Activador
Timocitos	Glucocorticoides
Timocitos	Anticuerpos anti-Receptor del linfocito T
Timocitos	Ionóforos de Calcio
Linfocitos	Toxina de la Difteria
Epitelio uterino	Ovariectomía
Células lúteas y de la granulosa	Gonadotropina
Próstata	Castración
Células cancerosas mamarias	Antiestrógenos y antiprogestinas

Tabla 1. Ejemplos de células y tejidos donde la apoptosis está asociada con la degradación del ADN.

Paralelamente durante la apoptosis se llevan a cabo la condensación de la cromatina y también el “blebbing” del protoplasma⁶. Se ha reconocido que todos estos cambios morfológicos son evidentes cuando los genes que codifican para la muerte celular son activados por estímulos microambientales como:

- El retiro de factores de viabilidad (tabla 1).
- La afectación celular por la presencia de glucocorticoides en ciertas células como los timocitos de ratón.
- Por la adición de anticuerpos antiantígenos de superficie como CD3 o el fas.
- La influencia de ciertos reguladores negativos como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y el Factor de Crecimiento Transformante tipo β (TGF β).

- La acción de agentes citotóxicos anticáncer.
- La presencia de ciertos genes como c-myc desregulado, adenovirus E1A, ced-3 y ced-4 en *C. elegans* y por la expresión del gen p53 de tipo salvaje⁷.

Los mecanismos de autodestrucción o suicidio celular probablemente no han evolucionado en los organismos unicelulares, pero en los organismos multicelulares tienen varias formas de manifestarse. Para conducir los fluidos, las células que forman el xilema en las plantas deben morir; lo mismo que las células de la cola del renacuajo y sus neuronas que forman las conexiones intercelulares. Aunque la muerte celular puede haber evolucionado en ejemplos morfogénicos como estos, también pudo haberse desarrollado como un mecanismo de defensa. Por ejemplo la hipersensibilidad en la respuesta de las plantas, en las cuales una célula detectora de una bacteria se autodestruye y advierte a las células vecinas las cuales se autodestruyen también. Esta forma de altruismo puede proteger al hospedero, permite a los genes de la muerte celular programada existentes en las células germinales pasar a las generaciones posteriores. De la misma manera en los animales las células sufren apoptosis cuando son expuestas a virus. Activan el mecanismo de suicidio celular eliminado de esta forma la producción de nuevas partículas de virus⁸.

4. PARTICULARIDADES DE LA APOPTOSIS

Apaf-1.

Estudios sobre la apoptosis utilizando al nemátodo *Caenorhabditis elegans* como modelo han identificado tres genes, ced-3, ced-4 y ced-9 como componentes principales en la muerte celular del nemátodo. El homólogo en los mamíferos para la proteína Ced-9, la cual funciona como un inhibidor de la apoptosis por encima de Ced-3 y Ced-4, ha sido identificada como Bcl-2. Las caspasas de los mamíferos, incluyendo CPP32 y ICE (Interleukin-1 β -Converting Enzyme) están relacionadas con Ced-3. La proteína de los mamíferos Apaf-1 contiene un dominio homólogo con Ced-4 y puede funcionar de una manera similar mediando la apoptosis por debajo de Bcl-2 y por encima de las caspasas. Apaf-1 se une al citocromo c citosólico, y puede mediar la activación de la caspasa 3 por citocromo c⁹.

Citocromo c.

El citocromo c es una proteína transportadora de electrones esencial para la conversión de energía en todos los organismos aeróbicos. En las células de los mamíferos, esta proteína altamente conservada está normalmente localizada en el espacio intermembranal. Estudios más recientes indican que el citocromo c es un factor necesario para la activación de la apoptosis. Durante la apoptosis, el citocromo c es translocado desde la membrana mitocondrial hasta el citosol, donde es requerido para la activación de la caspasa 3 (CPP32). La translocación del citocromo c puede ser inhibida por la sobre-expresión de Bcl-2, sugiriendo un papel en la prevención de la apoptosis por Bcl-2⁹.

Bcl-2/Bax y proteínas relacionadas.

Los miembros de la familia de Bcl-2 interactúan para regular la

muerte celular programada o apoptosis. Varios homodímeros y heterodímeros formados por esta familia de proteínas pueden promover o inhibir la apoptosis. Bcl-2 bloquea la muerte celular luego de una gran variedad de estímulos, y tiene un efecto de corto plazo en la muerte celular de ciertas líneas celulares cuando se retira el factor de sobrevivencia. Una proteína relacionada designada como Bax p21 (proteína x Bcl-asociada), tiene una homología de aminoácidos extensa con Bcl-2. Bax homodimeriza y forma heterodímeros con Bcl-2, anulando el efecto represor de la muerte celular de Bcl-2. Un miembro adicional de esta familia de proteínas es Bcl-xL, que reprime la apoptosis, mientras que la forma corta Bcl-xS, favorece la muerte celular. Otros miembros proapoptóticos de esta familia incluyen Bad, Bak, Bik (NBK), BID y Hrk. Se han incluido inhibidores adicionales de la apoptosis como Bcl-w, Mcl-1, Bag-1 y A1 (Bfl-1). La factibilidad de una célula a sufrir apoptosis depende de la proporción de estos reguladores negativos y positivos⁹.

5. PAPEL DE LA APOPTOSIS EN LA HEMATOPOYESIS

Ciertos tejidos son más accesibles y de más fácil manejo que otros para su estudio como es el caso del tejido hematopoyético. Las células de la sangre como cualquier otra célula, requieren de la presencia de ciertos factores para mantenerse viables y el retiro de dichos factores induce apoptosis⁷. El caso de la eritropoyetina (Epo) es más evidente al ser esta hormona producida casi exclusivamente por el riñón y controlado su suministro hacia la médula ósea¹⁰. Si ocurre una deficiencia de Epo los progenitores eritropoyéticos no se desarrollan y mueren por apoptosis. Para los otros factores de crecimiento hematopoyéticos sólo *in vitro*, se ha podido demostrar su acción al ser éstos prácticamente producidos por todos los tejidos y no poder ser controlado su abastecimiento a la médula ósea.

La apoptosis juega un papel central en la regulación de la cantidad de células tanto durante la embriogénesis como en los tejidos de alto recambio celular en la etapa adulta. El retiro de factores de crecimiento que actúan suprimiendo la muerte celular programada da lugar a la apoptosis en células hematopoyéticas^{11,12}, oligodendrocitos¹³ y neuronas¹⁴. La dependencia al factor estimulante de colonias de granulocitos en neutrófilos maduros¹⁵ y también la dependencia al factor de crecimiento de nervio en neuronas¹⁶ ilustra el principio de que la sobrevivencia puede ser disociada de la proliferación celular, lo cual fue confirmado posteriormente por la clonación de bcl-2, un proto-oncogen de sobrevivencia que no afecta el ciclo celular¹⁷.

La exposición de células primarias CD34+ a GM-CSF se ha demostrado previamente que resulta en la diferenciación granulomonocítica^{18,19}. Mientras que la presencia de Epo, y bajas concentraciones de IL-3 favorece la diferenciación eritroide¹⁸. Se han propuesto dos modelos para explicar el efecto de los factores de crecimiento hematopoyéticos: el modelo estocástico^{20,21}, y el modelo instructivo o inductivo²². Para apoyar el último modelo, se han reportado factores estimulantes de colonias que modulan la diferenciación²³ ejemplificado por la expresión ectópica de c-fms, el gen que codifica el receptor del

factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF o CSF-1), en una línea celular pre-B y que resulta en la diferenciación irreversible hacia macrófagos en presencia de CSF-1, pero no de IL-7²⁴. La línea celular multipotente de ratón FDCP sufre apoptosis en ausencia de IL-3 cuando la IL-3 es substituida por GM-CSF las células dejan de proliferar y se diferencian en granulocitos y monocitos. La expresión ectópica de GM-CSF en estas células también provoca la diferenciación granulomonocítica sincrónica en ausencia de IL-3, sugiriendo que la IL-3 mantiene el autorenewo de las células multipotentes mientras que el GM-CSF induce la diferenciación en macrófagos y granulocitos. Sin embargo, la expresión ectópica de bcl-2 rescata las células FDCP de la muerte por apoptosis permitiendo la diferenciación espontánea en ausencia de GM-CSF o Epo, argumentando que la diferenciación en macrófagos o eritrocitos en la línea FDCP-Mix ocurre en ausencia de señales inductivas²¹, sugiriendo que el compromiso de linaje es estocástico y probablemente no influido por citocinas o receptores de citocinas que están constitutivamente activados^{22,23}.

Ampliando esto, la inducción a la diferenciación mielocítica por CSF-1 en la línea mieloide 32D transfectada con c-fms se ha demostrado que es reversible²⁴ a diferencia de lo visto en células pre-B¹⁹ otra vez sugiriendo que el papel de CSF-1 en este modelo puede ser permisivo más que determinístico.

6. TERAPIAS BASADAS EN LA APOPTOSIS

Muchas de las enfermedades actuales pueden ser atribuidas directa o indirectamente a problemas con la apoptosis. Desordenes en los cuales la regulación inefectiva de la apoptosis contribuye a la patogénesis de la enfermedad o a su progresión pueden involucrar ya sea la acumulación de células, en la que la eradicación de células o renuevo esta dañada, o la pérdida de células en la que el programa de suicidio esta inapropiadamente encendido. La identificación de los genes y sus productos responsables de la apoptosis, junto con la información acerca de los mecanismos de acción y las estructuras regulatorias/proteínas efectoras, han establecido el descubrimiento de fármacos algunos de los cuales están ahora en proceso de evaluación en protocolos clínicos. La familia de proteínas Bcl-2, pro- y antiapoptóticas, son reguladores claves de la cascada de la apoptosis y de la ruta de caspasas mediada por la mitocondria. Dentro de esta familia, Bcl-2 fue el primer miembro identificado y permanece siendo el mejor caracterizado. La expresión aberrante de Bcl-2 es común en varios cánceres y se asocia con una baja respuesta a la quimioterapia y a un decremento en la supervivencia. Bcl-2 es un blanco atractivo para los nuevos agentes terapéuticos. Los nucleótidos antisentido dirigidos contra Bcl-2 son efectivos *in vitro* y están siendo evaluados en protocolos clínicos. Pequeñas moléculas inhibitorias de Bcl-2 están en desarrollo preclínico y deberán estar listas para su uso dentro de pocos años. Las estrategias que inducen apoptosis y evitan Bcl-2 pueden también ser útiles. De esta forma durante la siguiente década, se puede prever la incorporación de mediciones sobre proteínas apoptóticas como Bcl-2 en la evaluación de riesgo y tratamiento en pacientes. Además se puede anticipar que habrá terapias

introducidas en la clínica diseñadas racionalmente contra blancos moleculares específicos defectuosos en diversos tipos de cáncer^{25,26}.

7. EL CASO ESPECÍFICO DE LA LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA (LMA)

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) es un cáncer agresivo caracterizado por una acumulación de blastos leucémicos en sangre periférica a expensas de los linfocitos normales. En la LMA los blastos leucémicos se cree derivan de una subpoblación de precursores, detectados por su capacidad de formación de colonias en medio visificado con metilcelulosa^{27,28}. La eficiencia de resiembra se correlaciona con la respuesta a la quimioterapia, sugiriendo que el ensayo detecta una población biológicamente relevante²⁹. Además, los blastos de LMA tienen la misma capacidad de respuesta a los factores de crecimiento que las células normales cuando son sembradas a baja concentración. Contrariamente, estas células son capaces de estimulación autócrina (o paracrina) a alta concentración celular. Por lo tanto, la interacción celular parece ser un componente importante en la LMA³⁰.

La expansión progresiva es una característica del cáncer. Por lo tanto es razonable pensar que las células cancerosas necesitan de la estimulación autócrina que permitirá la expansión clonal al inicio de la enfermedad y la expansión acelerada de la masa tumoral en estadios posteriores. La estimulación autócrina en la LMA se correlaciona con una enfermedad agresiva. Varios estudios han demostrado que los blastos de LMA producen una multiplicidad de factores de crecimiento en cultivo: GM-CSF³¹, IL-1³², IL-6³³ y TNF³⁴. El mecanismo de la expresión genética era desconocido, y no parece involucrar un rearrreglo o amplificación génica³⁵. Datos provenientes del laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia de la Dra. Hoang del IRCM en Montreal Canadá, indican que la activación del gen de IL-1 en blastos de LMA es el evento primario en la producción múltiple de citocinas. Al cuantificarse la producción de factores de crecimiento en blastos de LMA por ELISA se demostró que era coordinada, por ejemplo la producción de IL-1, IL-6 y GM-CSF estaba altamente correlacionada ($r=0.8-0.9$). Más aun, la neutralización de la IL-1 endógena eliminó la producción de GM-CFS y disminuyó la producción de IL-6 así como el crecimiento autónomo^{36,37}.

Se ha demostrado que células irradiadas o preparaciones de membranas citoplasmáticas de blastos de LMA pueden reemplazar el requerimiento de la interacción celular en cultivo. Dado que la IL-1, IL-6 y el GM-CSF no son expresados en la superficie celular, es posible que estos factores contribuyan a la estimulación autócrina pero no a la interacción. Nuestro trabajo, sugiere que el mecanismo de interacción celular pueda ser atribuido a otra molécula, el Factor Steel.

Crecimiento autócrino en LMA.

El crecimiento de los blastos de LMA es dependiente de la densidad, a pesar de la presencia de factores de crecimiento sinérgicos (IL-1, IL-6, IL-11, TNFa, INFg)³⁸⁻⁴² y factores

mitogénicos (IL-3, GM-CSF)⁴³⁻⁴⁶. Nosotros hemos demostrado previamente que algunos blastos de LMA c-Kit+ expresan el factor de crecimiento de superficie SF el cual puede contribuir al crecimiento autocrino. Nuestros datos indican que entre todos los factores de crecimiento sinérgicos, el SF es el único que consistentemente reemplaza la interacción celular de blastos de LMA en cultivo. Así, la regresión lineal de la curva obtenida entre la formación de colonias en función del número de células sembrado describe una pendiente de 1 en presencia de SF y GM-CSF (o IL-3) sugiriendo un elemento simple limitante, por ejemplo la célula clonogénica de LMA. En contraste, los valores de pendiente en presencia de GM-CSF solo (o IL-3 solo) son de 2 o 3, sugiriendo poblaciones celulares interactuantes³⁰. Debido a que el SF soluble puede reemplazar la interacción celular en LMA, hemos investigado la posibilidad de que los blastos de LMA produzcan SF como parte de un sistema autócrino. La clonación del gen que codifica SF reveló un “splicing” alternativo que genera SF ligado a la membrana⁴⁶. Usando un anticuerpo monoclonal específico contra SF pudimos detectar la expresión de SF en la superficie de blastos de LMA por inmunofluorescencia³⁰. Las células habían sido tratadas con un baño ácido para eliminar el ligando unido al receptor antes de la inmunofluorescencia, sugiriendo que la inmunofluorescencia es debida al SF covalentemente unido a la membrana celular. Debido a que el SF soluble puede reemplazar la interacción celular de los blastos de LMA en cultivo, se postuló que la expresión de SF unido a la membrana es el principal componente de la proliferación celular y de la estimulación autócrina en la LMA.

La importancia del SF en la biología de los blastos de LMA³⁰ ha permitido el diseño de modelos in vivo del crecimiento de células de LMA humanas en ratones inmunodeficientes SCID, en el cual estuvimos implicados⁴⁷. El crecimiento autócrino en la LMA puede ser atribuido a dos componentes, un componente soluble (IL-1, IL-6 y GM-CSF) y un componente asociado a la membrana, el factor Steel, debido a que el SF, soluble actúa sinérgicamente con el GM-CSF o IL-6 para mantener el crecimiento de los blastos de LMA en cultivo, es posible que en la LMA, el SF transmembranal sinergice con las fuente endógena de GM-CSF o de IL-6 para mantener el crecimiento de los blastos de LMA en cultivo, y confiera una ventaja de crecimiento a las células leucémicas. Los objetivos de nuestra investigación han sido investigar directamente el papel del SF en el crecimiento autocrino y definir mecanismos o vías de bloqueo del asa autócrina del LMA.

Medicina genética

Los últimos descubrimientos en el campo de los fármacos genéticos, es decir moléculas que se unen directamente a los ácidos nucleicos ADN y ARN han sido discutidos recientemente⁴⁸. La característica de “antisentido” en el diseño de los fármacos genéticos, en el cual una simple hebra de oligonucleótido ADN análogo se une e inhibe la copia de ARN de un gen, conlleva una aparente simplicidad química de reconocimiento molecular. La formación de un híbrido ADN-

ARN se basa en el apareamiento de bases según Watson-Crick. A pesar de la aparente transparencia del mecanismo, sin embargo los oligonucleótidos, típicamente 15 nucleótidos de largo, son grandes moléculas de difícil distribución hacia el interior de las células. Otra clase de moléculas antisentido, los fosforotioatos, tienen un sulfuro en el esqueleto oligonucleotídico en lugar de un átomo de oxígeno y son los análogos de ADN más promisorios hasta el momento. En la actualidad seis agentes antisentido de este tipo provenientes de la compañía ISIS Pharmaceuticals están en protocolos clínicos de investigación en humanos para el uso en el tratamiento del cáncer y el HIV, y como agentes antiinflamatorios.

Detención de la traducción usando un antisentido de SF

Los oligonucleotidos antisentido son modificados para incrementar su estabilidad y se ha demostrado que entran a las células y permanecen estables por un tiempo suficientemente prolongado para detener eficientemente la traducción de ARNm, algunos de ellos incluyen oligos contra IL-1, c-myc⁴⁹, c-myb de un gen de respuesta temprana requerido para la diferenciación de macrófagos egr-1⁵⁰. En nuestro proyecto, sobre cáncer cervicouterino y leucemias, se diseñó un antisentido de factor Steel (SF-AS) de 20 pares de bases alrededor del codón de iniciación de la traducción ATG, en una región carente de estructuras stem-loop para favorecer la hibridación. El antisentido está modificado por un fósforo-tioato para incrementar la estabilidad en el interior de célula.

Nuestra propia investigación ha definido el papel antiapoptótico del SF transmembranal en la interacción celular y el crecimiento autócrino en LMA y ahora hemos ampliado nuestras observaciones al cáncer cervicouterino. La incidencia del carcinoma cervical en mujeres en Perú es de 54 por 100000, el más alto en el mundo. Similarmente, cerca de 30% de los tumores malignos en mujeres en México son carcinomas del cervix y del útero. El cáncer invasivo cervical ocurre más frecuentemente en mujeres por encima de los 40 años de edad y es una de las primeras causas de muerte relacionadas con cáncer en Latino América. El tratamiento actual consiste en cirugía y radioterapia. Las radiaciones y los agentes quimioterapéuticos inducen apoptosis en células cancerosas pero la selectividad continúa siendo una prioridad. Las drogas genéticas que tienen como blanco los ácidos nucleicos pueden proveer tal especificidad. Dentro de nuestros objetivos a futuro está la posibilidad de realizar xenotrasplantes de LMA y células de carcinoma de cervix en ratones inmunodeficientes. Además, la disponibilidad de modelos de ratones para tumores testiculares permitirá la evaluación preclínica del antisentido de SF en tumores in vivo. Nuestros resultados indican que tanto la leucemia mieloblástica aguda como el cáncer cervicouterino, el crecimiento exponencial es dependiente de la concentración celular sugiriendo un requerimiento de la interacción celular. La inhibición por el antisentido del SF asociado a la membrana bloquea la interacción y así el contacto célula/célula mediado por la asociación c-Kit con el SF ligado a la membrana induciendo apoptosis⁵¹. Recientemente se ha reportado que el SF regula a la alta Bcl-2

en precursores hematopoyéticos, resultados que sugieren un posible mecanismo de protección de SF de la apoptosis en todas aquellas células c-Kit⁺⁵².

REFERENCIAS

- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
- Compton, M.M., Cidlowski, J.A. (1992) Thymocyte apoptosis: a model of programmed cell death. *Trends Endocrinol. Metab.* 3:17-23.
- Arends, M.J., Wyllie, A.H. (1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32:223-254.
- Kerr, J.F.R., Harmon, B.V. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective, in Tomei L. D., Cope F. O. (eds). *Current Communications in Cell and Molecular Biology*, vol. 3 Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, (1991), p 5.
- Alles A., et al. (1991) Apoptosis: a general comment. *FASEB J.* 5:2127-2128.
- Cohen, J.J., Duke, R.C. (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 10:267-293.
- Sachs, L., Lotem, J. (1993) Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. *Blood* 82:15-21.
- Vaux, D., Haeccker, G., Strasser, A. (1994) An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76:777-779.
- Reed JC. (2003) Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell.* 3:17-22.
- Koury, M.J. (1992) Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 20:391-394.
- Caceres-Cortes J, Rajotte D, Dumouchel J, Haddad P, Hoang T. (1994) Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol. Chem.* 269:12084-91.
- Cáceres-Cortés J.R., Krosil G., Hugo P., Tessier N., Hoang T. (2001A) Steel factor sustains SCL expression and the survival of purified CD34+ bone marrow cells in the absence of detectable cell differentiation. *Stem Cells* 19:59-70.
- Sposi NM, Zon LI, Care A, Valtieri M, Testa U, Gabbianelli M, Mariani G, Bottero L, Mather C, Orkin SH, Peschle C: (1992) Cell cycle-dependent initiation and lineage-dependent abrogation of GATA-1 expression in pure differentiating hematopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6353.
- Voso MT, Burn TC, Wulf G, Lim B, Leone G, Tenen DG: (1994) Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7932.
- Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L: (1963) A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51:29.
- Nakahata T, Gross AJ, Ogawa M: (1992) A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture. *J Cell Physiol* 113:455.
- Curry JL, Trentin JJ: (1967) Hemopoietic spleen colony-stimulating factors. *Science* 236:1229.

18. Metcalf D: (1991) Lineage commitment of hemopoietic progenitor cells in developing blast cell colonies: influence of colony-stimulating factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11310.
19. Borzillo GV, Ashmun RA, Sherr CJ: (1990) Macrophage lineage switching of murine early pre-B lymphoid cells expressing transduced *fms* genes. *Mol Cell Biol* 10:2703.
20. Just U, Stocking C, Spooner E, Dexter TM, Ostertag W: (1991) Expression of the GM-CSF gene after retroviral transfer in hematopoietic stem cell lines induces synchronous granulocyte-macrophage differentiation. *Cell* 64:1163.
21. Fairbairn LJ, Cowling GJ, Reipert BM, Dexter TM: (1993) Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* 74:823.
22. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM: (1993) Lineage commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and does not appear to be influenced by cytokines. *J Cell Physiol* 157:579.
23. Pharr PN, Ogawa M, Hofbauer A, Longmore GD: (1994) Expression of an activated erythropoietin or a colony-stimulating factor 1 receptor by pluripotent progenitors enhances colony formation but does not induce differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7482.
24. Pierce JH, Di Marco E, Cox GW, Lombardi D, Ruggiero M, Varesio L, Wang LM, Choudhury GG, Sakaguchi AY, Di Fiore PP, Aaronson SA: (1990) Macrophage-colony-stimulating factor (CSF-1) induces proliferation, chemotaxis, and reversible monocytic differentiation in myeloid progenitor cells transfected with the human *c-fms*/CSF-1 receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5613.
25. Reed JC. (2002) Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 1:111-21.
26. Schimmer AD, Munk-Pedersen I, Minden MD, Reed JC. (2003) Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol.* 4:211-8.
27. Moore, M.A.S., spitzer, G., Williams, N., Metcalf, D., Buckley, J. (1974). Agar culture studies in 127 cases of untreated acute leukemia: the prognostic value of reclassification of leukemia according to in vitro growth characteristics. *Blood* 44,1-18.
28. Buick, R.M., Minden, M.D., McCulloch, E.A. (1979). Self renewal in culture of proliferative blasts cells circulating in myeloblastic leukemia. *Lancet* 1, 862-863.
29. Buick RN, Chang LJ, Messner HA, Curtis JE, McCulloch EA. (1981) Self-renewal capacity of leukemic blast progenitor cells. *Cancer Res* 41:4849-52.
30. Cáceres-Cortés JR, Hoang T. (1992) Product of the Steel locus can replace leukemic cell interaction. *Cancer Res* 52:5208-12.
31. Griffin, J.D., Rambaldi, A., Vellenga, E., Young, D.C., Ostapovicz, D., Cannistra, S.A. (1987). Secretion of interleukin-1 by acute myeloblastic leukemia cells in vitro induces endothelial cells to secrete colony stimulating factor. *Blood* 70,1218.
32. Cozzolino, F., Rubartelli, A., Aldinucci, D., Sitia, R., Torcia, M., Shaw, A., Di Guglielmo, R. (1989). Interleukin-1 as an autocrine growth factor for acute myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2369.
33. Van der Schoot, C.E., Jansen, P., Poorter, M., Wester, M.R., von dem Borne, A.E.G.K., Aarden, L.A., van Oers, R.H.J. (1989). Interleukin-6 and interleukin-1 production in acute leukemia with monocytoid differentiation. *Blood* 74,2081.
34. Oster, W., Cicco, N.A., Klein, H., Hirano, T., Kishimoto, T., Lindemann, A. Merteismann, R.H., Hermann, F. (1989). Participation of the cytokines interleukin 6, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin 1-beta secreted by acute myelogenous leukemia blasts in autocrine and paracrine leukemia growth control. *J. Clin. Invest.* 84, 451.
35. Cheng GY, Kelleher CA, Miyauchi J, Wang C, Wong G, Clark SC, McCulloch EA, Minden MD. (1988) Structure and expression of genes of GM-CSF and G-CSF in blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia. *Blood* 71:204-8.
36. Rodriguez-Cimadevilla JC, Beauchemin V, Villeneuve L, Letendre F, Shaw A, Hoang T. (1990) Coordinate secretion of interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: role of interleukin-1 as an endogenous inducer. *Blood* 76:1481-9.
37. Beauchemin V, Villeneuve L, Rodriguez-Cimadevilla JC, Rajotte D, Kenney JS, Clark SC, Hoang T. (1991) Interleukin-6 production by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: regulation by endogenous interleukin-1 and biological implications. *J Cell Physiol* 148:353-61.
38. Hoang, T., Haman, A., Goncalves, O., Letendre, F., Mathieu, M., Wong, G.G., Ciark, S.C. (1988). Interleukin 1 enhances growth factor-dependent proliferation of the clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia and of normal human primitive hemopoietic precursors. *J. Exp. Med.* 168. 463-474.
39. Hoang T, Haman A, Goncalves O, Wong GG, Clark SC. Interleukin-6 enhances growth factor-dependent proliferation of the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1988 72:823-6.
40. Hu JP, Cesano A, Santoli D, Clark SC, Hoang T. (1993) Effects of interleukin-11 on the proliferation and cell cycle status of myeloid leukemic cells. *Blood* 1993 81:1586-92.
41. Hoang T, Nara N, Wong G, Clark S, Minden MD, McCulloch EA. (1986) Effects of recombinant GM-CSF on the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Blood* 68:313-6.
42. Murohashi I, Hoang T. Interferon-gamma enhances growth factor-dependent proliferation of the clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 1991 78:1085-95.
43. Miyauchi J, Kelleher CA, Yang YC. (1987) The effects of three recombinant growth factors IL-3, GM-CSF and G-CSF, on the blast cells of acute myeloblastic maintained in short term suspension culture. *Blood* 69:657-63.
44. Budel LM, Elbaz O, Hoogerbrugge H, Delwel R, Mahmoud LA, Lowenberg B, Touw IP. (1990) Common binding structure for granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on human acute myeloid leukemia cells and monocytes. *Blood* 75:1439-45
45. Vellenga E, Young DC, Wagner K. (1987) The effects of GM-CSF and G-CSF in promoting growth in clonogenic cell in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 69:1771-6.
46. Fleischman, R.A. (1993) From white spots to stem cells: the role of the kit receptor in mammalian development. *Trends Genet.* 9, 285-290.
47. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Cáceres-Cortés J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. (1994) A cell

VERTIENTES

initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367:645-8

48. Congreso Nobel. "Gene-Targeted drugs: function and delivery" held in Stockholm, Sweden 3 to 5 April 1998.

49. Wickstrom, E.L., Bacon, T.A., Gonzalez, a., Freeman, D.L., Lyman, J.H. and Wickstrom E. (1988). Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and c-myc protein expression are inhibited by an antisense pentadecadeoxynucleotide targeted against c-myc mRNA. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 85,1028-1032.

50. Nguyen, H.Q., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D.A.

(1993). The Zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* 72, 197-209.

51. Caceres-Cortes JR, Alvarado-Moreno JA, K. Waga., Rangel-Corona R, A. Monroy-García, L. Rocha-Zavaleta, J. Urdiales-Ramos, Weiss-Steider B, A. Haman, Brousseau R, Hoang T. (2001B) Implication of tyrosine kinase receptor and Steel Factor in cell-density dependent growth in cervical cancers and leukemias. *Cancer Res.* 61:6281-6289

52. Zeuner A, Pedini F, Signore M, Testa U, Pelosi E, Peschle C, De Maria R. (2003) Stem cell factor protects erythroid precursor cells from chemotherapeutic agents via up-regulation of BCL-2 family proteins *Blood.* 102:87-93