

Receptores histamínicos H₂, AMPc y diferenciación celular leucémica

Brodsky, A.; Davio, C.**; Shayo, C.***; Lemos, B.**; Barboza, M.*; Baldi, A.***; Sanchez Avalos, J.C.*

*División Hematología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires

**Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

***Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas

Correspondencia a Andrés L. Brodsky, Unidad de Trasplante de Médula Osea, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Av. Córdoba 2351, 8° Piso Buenos Aires.
E-mail: albrodsky@radar.com.ar

Este trabajo fue premiado en el XIV Congreso Argentino de Hematología



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 4 N° 2: 57-76
Mayo-Agosto, 2000

RESUMEN

Con el objeto de explorar su potencial empleo en terapéuticas no citotóxicas, se estudió, en células leucémicas humanas, la vía de señalización y probable rol regulatorio del receptor a histamina H₂.

Mediante ensayos de binding, se detectaron sitios de unión específica de tipo H₂, en casi todas las muestras de M.O. y S.P. de pacientes con L.A., con diferentes grados de infiltración. Esto sugiere la presencia del receptor H₂ en células hemopoyéticas normales y transformadas.

La línea U-937, modelo de célula monoblástica, presenta receptores H₂ acoplados al AMPc. Su estímulo no produjo cambios proliferativos, ni diferenciación celular, pero sí un aumento transitorio, vía proteína quinasa A (PKA), en la expresión de Fos y Jun, sin reducción de Myc.

Se hipotetizó que el fracaso del estímulo H₂ para diferenciar las células U-937 podría deberse a que su activación de la PKA es breve. Concordante con lo anterior, los receptores H₂ mostraron una veloz desensibilización homóloga (T. ½ = 20'). En cambio la forskolina, un activador directo de la adenil ciclasa, no desensibilizó su estímulo ni aún después de 24 horas de incubación.

La forskolina también inhibió la proliferación U-937 a las mismas concentraciones en que estimuló la síntesis de AMPc e indujo su diferenciación fagocitaria, con reducción del NBT y respuesta quimiotáctica al C5a.

Conclusiones: 1) La desensibilización veloz de un receptor que transduce una señal diferenciadora, como el H₂ en las células U-937, podría ser un mecanismo fisiopatogénico de la malignización, al bloquear la recepción de estímulos madurativos por la célula neoplásica. 2) Dados estos resultados, y los efectos diferenciadores del dibutiril AMPc (DBAMPc) en líneas celulares mieloides, los agentes que elevan el AMPc merecen ser valorados en la terapia de las LMA.

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas (LA) constituyen las neoplasias más frecuentes en niños y adultos jóvenes⁽¹⁾. Libradas a su evolución espontánea, su curso es rápidamente fatal⁽²⁾ -a consecuencia de infecciones o sangrados- producto principalmente del déficit de células maduras de la sangre, que trae aparejada la expansión clonal leucémica.

Su tratamiento consiste, hoy en día, en la administración de drogas citotóxicas, a las que estas células neoplásicas son sensibles, con el objeto de reducir su número a cifras que puedan ser controladas por el sistema inmune del paciente -o de un dador en el caso de los trasplantes alogeneicos de médula ósea-. Dado que dichas drogas son venenos celulares (dañan el ADN, enzimas, membranas celulares, interfieren con la síntesis proteica, etc.), la toxicidad de estos tratamientos es considerable. Por ello gran parte de los esfuerzos en investigación están destinados a descubrir los mecanismos por los cuales se generan, perpetúan y adquieren predominancia las células leucémicas. El objetivo, en el campo terapéutico, es poder disponer de tratamientos dirigidos específicamente a corregir las anomalías presentes en estas células, evitándose la toxicidad a los tejidos normales.

Un primer éxito terapéutico en este sentido se obtuvo con el tratamiento con ácido trans-retinoico (A.T.R.A.) en leucemia promielocítica aguda (A.P.L.), al punto que su incorporación en el arsenal terapéutico ha mejorado drásticamente el pronóstico de estos enfermos -la mayoría de ellos es hoy curable con los tratamientos disponibles⁽³⁾. Otras intervenciones

terapéuticas destinadas a favorecer la diferenciación y/o apoptosis en LA están en distintas fases de estudio^{(4),(5)}.

La histamina ha sido asociada a través de diversas evidencias, al proceso de hematopoyesis. Por un lado fue descrita la producción de histamina en respuesta a IL-3 o GM-CSF en células hematopoyéticas mieloides inmaduras de ratón, derivadas de médula ósea, hígado fetal y bazo⁽⁶⁾. Esta población también ha sido detectada en humanos. Por otro lado, la histamina induce la proliferación de células stem pluripotenciales y regula su ciclo celular⁽⁷⁾. Más aún, se ha demostrado que la histamina estimula la diferenciación de precursores granulocíticos normales⁽⁸⁾ e induce, a través del receptor H_2 , con aumento del AMPc y consecuente activación de la PKA, la diferenciación de la línea celular leucémica HL-60⁽⁹⁾. La diferenciación de neutrófilos murinos inducida por rG-CSF se incrementa por pretratamiento con histamina, debido principalmente a un aumento en los receptores de G-CSF⁽¹⁰⁾.

La línea celular monoblástica U-937 fue establecida en 1976 a partir del derrame pleural de un paciente con un linfoma histiocítico difuso⁽¹¹⁾. Junto a la línea HL-60, han sido las más empleadas para el estudio de la diferenciación monocito-macrofágica⁽¹²⁾.

A pocos años de haber sido aislada la línea U-937, se estableció su capacidad de diferenciarse ante distintos estímulos: ésteres del forbol⁽¹³⁾, ácido retinoico⁽¹⁴⁾ y 1,25 di-hidroxi vitamina D_3 ^{(15),(16)}. Originalmente se observó que agentes que elevaban el AMPc (PGE₂, toxina colérica) o sus análogos (DBAMPc) no las diferenciaban, pero luego se comprobó que concentraciones más elevadas de DBAMPc sí lo hacían^{(17),(18)}.

Como el tema del presente trabajo era evaluar el rol de la vía del receptor histamínico H_2 en células leucémicas de estirpe mielomonocitaria, se eligió a la línea U-937 como modelo de célula precursora monocitaria transformada.

Nuestros objetivos experimentales fueron:

- i) Estudiar la presencia de sitios de unión específica a histamina (SUEH) de tipo H_1 y fundamentalmente H_2 en blastos de pacientes con L.A.
- ii) Establecer que efectos ejerce su estimulación sobre la proliferación, diferenciación y expresión de algunos proto-oncogenes nucleares en la línea celular U-937.
- iii) Analizar los efectos que sobre la proliferación, diferenciación y expresión de proto-oncogenes nucleares en las células U-937 ejercen agentes que estimulan la vía del receptor H_2 en diferentes sitios de la misma (adenilciclase, PKA).
- iv) Estudiar el fenómeno de desensibilización homóloga del receptor H_2 en estas células y su probable implicancia en las respuestas observadas.

El fin último de estas investigaciones es aumentar los conocimientos básicos sobre la inducción de la diferenciación en L.A. para contribuir al diseño de nuevas terapéuticas, no citotóxicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes: Ingresaron al presente estudio enfermos mayores de 15 años, con diagnóstico de L.A., atendidos en el Servicio de Hematología del H.S.M.

Muestras de pacientes con L.A.: se estudiaron muestras de médula ósea, o de sangre periférica -en caso de presentar abundantes blastos en circulación-. Se separaron las células nucleadas mediante lisis hipotónica de hematíes, o las células mononucleares por gradiente de Ficoll-Hypaque.

Células U-937: Las células U-937, cedidas gentilmente por la Dra. Rolande Berthier, (investigadora del INSERM, Grenoble, Francia), fueron replicadas en RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con S.B.F. al 10% (v/v) (GIBCO) en estufa gaseada a 37°C con 100% de humedad y 5% de CO_2 . En todos los experimentos se emplearon células cuya viabilidad, determinada por exclusión de tripan blue, fuese $\geq 90\%$.

Reactivos: para el test de MTT se empleó el kit cell titer 96™ de Promega (Wisconsin, EEUU) que fue utilizado según las especificaciones del fabricante.

El kit Cell Titer 96™ AQ (catálogo G5421) que contiene las soluciones de MTS y PMS fue adquirido también a Promega y empleado según las especificaciones del fabricante.

La seroalbúmina bovina (BSA), el 3'5'AMPc, la lactoperoxidasa, el dextrán, y el metil-isobutilxantina (MIX) fueron adquiridos a Sigma Chemical Co, USA. Se adquirió Sephadex G-75 a Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Suecia.

Drogas: La forskolina y el DBAMPc fueron adquiridos a Calbiochem. El C5a recombinante humano (rhC5a), la prostaglandina E_2 (PGE₂) y la 1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina (H-7) fueron obtenidos de Sigma Chemical Company.(St. Louis, MO, USA).

Todas las drogas fueron esterilizadas por filtración, fraccionadas y guardadas en freezer a -70°C al abrigo de la luz. Una alícuota de cada droga utilizada fue descongelada y diluida en el medio usado en el experimento en forma previa inmediata antes de su empleo.

El kit Random primer DNA labeling empleado es el de BIO-RAD.

Todos los otros reactivos empleados fueron de grado analítico.

Agonistas y antagonistas histamínicos: La histamina fue adquirida a Sigma. La trifluorometilfenilhistamina (FMFH, agonista H_1), arpromidina, dimaprit y BU-E-75 (agonistas H_2) fueron generosa-

mente provistos por los doctores W. Schunack de la Freie University de Berlín (Alemania) y A. Buschauer de la Universidad de Regensburg (Alemania). Las 5 drogas fueron diluidas en buffer trisclorhídrico (pH: 7,4) y esterilizadas por filtración. La pirilamina, famotidina y ranitidina (Sigma) fueron disueltas en etanol absoluto (Merck) a una concentración 10 mM y esterilizadas. La histamina fue empleada en los experimentos en forma inmediata. Los agonistas semisintéticos y los antagonistas fueron guardados en freezer a -20°C al abrigo de la luz. Previamente a su empleo en cada ensayo, una alícuota fue descongelada y diluida en el medio del experimento.

Drogas radioactivas: El Material radiactivo adquirido a New England Nuclear (USA), fue el siguiente: [^3H]-Histamina 2HCl (NET 732, AE: 42.6 Ci/mmol); [^3H]-Tiotidina (NET 688, AE: 75 Ci/mmol); [^3H]-Pirilamina (NET 594, AE: 24.8 Ci/mmol); 2,8-[^3H]-AMPc (NET 275, AE: 30.5 Ci/mmol); [^{125}I]-Na (NEZ 093), [^3H]-AMPc y a [^{32}P]-dCTP.

Anticuerpos monoclonales: El antiCD14 murino (IgG1) conjugado con fluoresceína fue adquirido a Dako. El antiCD11b murino (IgG1) fue un anticuerpo de referencia (S_{127}) del 4 $^{\circ}$ Workshop Internacional de Tipificación de Antígenos Leucocitarios (Boston, USA, 1.993).

Anticuerpos policlonales: Se adquirió suero de conejo anti proteínas Myc, Jun y Fos de Santa Cruz Biotechnology (CA, U.S.A.).

Sondas de cDNA para hibridización en los experimentos de Northern blot: Se utilizaron como sondas a) un fragmento de 1,8 Kb de cDNA de c-fos humano clonado en el plásmido pBK28, donado generosamente por el Dr. I. Verma (Salk Institute, USA) y cortado por las enzimas Xho1-EcoR1; b) un fragmento de 1,4 Kb cortado por las enzimas Cla1-EcoR1 que contiene cDNA del 3 $^{\circ}$ exón de c-myc humano obtenido del plásmido pHSR1 (comprado al ATCC) y c) un fragmento de 1,2 Kb de cDNA del gen de GAPDH humano cortado por la enzima Pst1 (provisto gentilmente por el Dr. A. Kornblihtt, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA).

Tipificación de las L.A.: Por estudios morfológicos en los frotis teñidos con May Grunwald-Giemsa; citoquímicos con tinciones para mieloperoxidasa, glucógeno (PAS), fosfatasa ácida, esterasa inespecífica resistente y sensible a fluoruro de sodio; e inmunofenotipificación con anticuerpos monoclonales murinos y citometría de flujo, se clasificó a las L.A. en:

- Mieloides y por subtipo FAB (de M_0 a M_7)
- Linfoides: a) Nula
 - b) Común
 - c) T
 - d) B
- Mixtas

Ensayos de unión con histamina: En todos los experimentos de unión con radioligandos se emplearon 10^6 células enteras, resuspendidas en buffer Tris-ClH 50 mM (pH 7,4), incubadas a 4°C durante 60 minutos.

Se enfrentaron las células con [^3H]-Histamina (entre 0,63 y 60 nM final). Para evaluar la unión inespecífica se trabajó con una concentración 10 mM de histamina fría en el medio de incubación.

Los ensayos se terminaron con el agregado de 2 ml de buffer frío, filtrado a través de membranas de fibra de vidrio tipo GF-B, y tres lavados posteriores con buffer frío. Las membranas se secaron en estufa a 37°C y posteriormente fueron transferidas a viales con solución centelladora (PPO, POPOP y Tolueno). Las actividades se midieron en un contador de centelleo líquido.

Ensayos de unión con tiotidina: en estos estudios de binding se utilizó buffer sin MgCl_2 . Se estudiaron 7 concentraciones crecientes de radioligando (de 0,9 a 60 nM final) por duplicado. Luego se agregó buffer frío y se filtró según se describe con la [^3H]-histamina.

La unión inespecífica se calculó agregando una concentración 1 mM de histamina fría en el medio de incubación.

Ensayos de unión con pirilamina: los ensayos de saturación se realizaron con 12 concentraciones crecientes del radioligando (de 0,1 a 60 nM final). Se finalizó con el agregado de buffer frío y filtración.

La unión inespecífica se calculó agregando una concentración 10 mM de pirilamina fría en el medio de incubación.

Estudio del AMPc intracelular: las células fueron lavadas y resuspendidas en medio de Hanks a una concentración de 10^6 cel/ml, con isobutilmetilxantina (IBMX) 10^{-3} M, preincubadas por 3 minutos a 37°C y expuestas a continuación a las condiciones experimentales en estudio durante 9 minutos. La reacción fue frenada mediante una centrifugación a $3.000 \times G$ durante 3 minutos, el agregado de etanol absoluto y la posterior conservación en hielo. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a $3.000 \times G$ por 10 min., la fase con etanol secada y resuspendida en buffer trisclorhídrico 50 mM. El contenido de AMPc fue determinado por un ensayo de competición con [^3H]AMPc para la PKA⁽¹⁹⁾.

En los experimentos de desensibilización, las células fueron pretratadas con agonista H_2 (dimaprit o BU-E-75 10 μM) o con forskolina 75 μM (respuesta máxima), desde 1 minuto a 24 hs en ausencia de IBMX. Posteriormente las células fueron lavadas y resuspendidas con IBMX 1 mM a una concentración de 10^6 cel/ml y expuestas al agonista H_2 o a diferentes estímulos que elevan el AMPc, por 9 minutos, la reacción fue frenada y el AMPc cuantificado, para determinar si los receptores a histamina H_2 podían, aún,

generar AMPc, si la desensibilización estaba confinada al receptor de histamina H₂, o si involucraba otras etapas de la vía de señalización.

Ensayos de cinética proliferativa: Se colocaron en botellas de cultivo de tejido de 25 cm² (Falcon) 5 a 8 ml de una suspensión de células U-937, con el agregado de drogas o de solvente (control). Las concentraciones celulares iniciales oscilaron entre 10.000 y 50.000/ml. Los tiempos de cultivo variaron entre los 3 y 6 días y a intervalos de 12 a 48 horas se efectuaron recuentos celulares en cámara de Neubauer. En todos los casos se determinó el porcentaje de células viables por exclusión del tripan blue.

Test del MTT: el test de MTT fue efectuado como se describe en la bibliografía (20). En síntesis, se sembraron, en una policubeta de cultivo de tejidos de 96 hoyos de fondo plano, 1.000 a 5.000 células por hoyo, con la droga en estudio, en un volumen final de 100 µL. Cada condición experimental fue testada por cuadruplicado. El blanco estuvo constituido por 100 µL/hoyo de medio de cultivo y el control por células con solvente de la droga. Tras 3 o 4 días de cultivo, se añadieron 15 µL de solución de MTT/hoyo y la policubeta fue incubada por 4 horas. Luego, se agregaron 100 µL de solución solubilizadora-frenadora/hoyo, se incubó durante la noche y tras una breve agitación, se leyeron las densidades ópticas (O.D.) en un lector vertical de ELISA Titertek Multiscan MCC/340.

Determinación de la expresión de antígenos mieloides de superficie: Tras diferentes tratamientos, las células fueron lavadas con PBS, distribuidas en alícuotas de 10⁶/tubo, incubadas 15 minutos a 37°C en RPMI 1640 con suero AB humano al 5% e inmunomarcadas con anti CD14 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con anti CD11b y anti IgG₁ murina de cabra conjugado con FITC como 2° anticuerpo. Las incubaciones fueron efectuadas a 4°C, al abrigo de la luz, durante 30 minutos. Luego las células fueron lavadas 3 veces y resuspendidas en PBS.

Los controles negativos fueron IgG₁ murina irrelevante, conjugada con FITC o sin conjugar.

Una vez marcadas, las células fueron estudiadas con un citómetro de flujo FACStar plus (Becton Dickinson) con un haz de láser de argón de 488 nm. Los resultados fueron analizados con el software Lysys (Becton Dickinson). Se adquirieron 5.000 eventos por tubo. Se registraron la fluorescencia verde emitida y la dispersión de la luz a 90° y a 180° como medidas de la densidad de antígeno de superficie, tamaño y granularidad celular.

Para cada grupo de tratamiento -incluyendo al control- se calcularon las diferencias entre las intensidades de fluorescencia media de las células inmunomarcadas y su control negativo correspondiente.

Ensayo de quimiotaxis: La migración «*in vitro*» de las células U-937 fue estudiada mediante la técnica del filtro con microporos. Se sembraron 10⁵ células en 0,1 ml de RPMI 1640, con Hepes 10 mM y 0,5% albúmina sérica humana (HSA) en el compartimiento superior de una cámara quimiotáctica (Transwell 3415; Costar Corp., Cambridge, MA) colocada, una en cada hoyo, en una policubeta de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Corning, USA). Los compartimientos superior e inferior así delimitados están separados por un filtro de policarbonato libre de PVP -con un tamaño de poro de 5 µm-. El compartimiento inferior fue llenado con 0,6 ml de medio (RPMI 1640, 10 mM Hepes con HSA al 0,5%) sin o con rhC5a. Las cámaras fueron incubadas por 1 a 3 hs -según necesidad- a 37 °C, 100% de humedad y 5% de CO₂. Luego se removieron los filtros con el contenido de la cámara superior y las células migradas al compartimiento inferior fueron recolectadas y contadas mediante citometría de flujo con un citómetro «Cytoron» (Ortho Diagnosis, NJ, USA), equipado con el programa «Absolute». Cada condición experimental fue estudiada al menos por duplicado o, más frecuentemente, por triplicado.

Reducción del Nitrobluetetrazolium (NBT): Se mezclaron 0,5 ml de suspensión celular en medio de cultivo con un volumen similar de NBT disuelto al 0,1% en PBS y 0,15 ml de una solución de 4β-forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) en RPMI 1640 a una concentración de 1 ng/ml. La mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C, 100% de humedad, 5% de CO₂ y 95% de aire. La proporción de células que contenían depósitos intracelulares de formazán fue determinada mediante recuento al microscopio óptico en preparados citológicos obtenidos por citocentrifugación y teñidos con May Grunwald-Giemsa. Se evaluó un mínimo de 200 células por citopreparado y 2 preparados (o más) por cada tratamiento.

Estudios de los niveles de transcripción de oncogenes: El nivel de expresión de c-fos y c-myc fue estudiado en diferentes condiciones mediante un análisis de Northern blot. Tras aislarse el ARN total, alícuotas de 20 µg fueron sometidas a una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% -formaldehído 0,8 M, luego transferidos a membranas ZetaProbe (Bio Rad) e hibridizadas "overnight" a 45°C con la sonda marcada mediante el kit "random primer" con ³²P >10⁶cpm/ml, en 0,125 M cloruro de sodio, 0,250 M fosfato de sodio (pH 7,2), 5% SDS, 10% polietilenglicol (PEG), 50% formamida. Los filtros fueron luego lavados y expuestos a films AGFA Curix RP1. Los autorradiogramas fueron analizados cuantitativamente con la ayuda de un scanner LKB (Suecia). Todos los resultados de hibridización específica del ARNm fue estandarizada con el empleo de cDNA del

gen constitutivo gliceraldehído-3-P dehidrogenasa (GAPD) como control.

Western blots: 3×10^6 células por condición experimental fueron lisadas en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, con 2% de SDS, 2 mercaptoetanol 100mM, 10% de glicerol y 0,05% de azul de bromofenol y sonicadas para fragmentar el ADN. Las muestras así obtenidas fueron hervidas durante 5 minutos, se extrajeron fracciones que se sometieron a una corrida electroforética en geles de poliácridamida al 12% con SDS y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Los sitios de unión residual fueron bloqueados con leche descremada al 5% en TBST (buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM y Tween-20 al 0,05%) y luego las membranas fueron incubadas con 2 mg/ml de anticuerpo primario específico en leche descremada al 3% en TBST. Todos los lavados subsiguientes se hicieron en TBST. La reacción se reveló con un suero policlonal anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante y los reactivos del kit ECL (de quimioluminiscencia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Amersham Life Science, Inglaterra).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Resultados cualitativos (proporciones): El test de χ^2 se empleó para comparar las proporciones de células que reducen NBT. Para subcomparaciones entre algunos de los grupos experimentales, cuando ello fue de interés, se calculó el valor de χ^2 por partición de grados de libertad.

Estudio y comparación de cinéticas proliferativas: Se efectuaron análisis de regresión lineal de los logaritmos naturales de los recuentos celulares obtenidos en el período de crecimiento exponencial en función del tiempo para cada experimento y condición de tratamiento. Luego se compararon las cinéticas de los diferentes tratamientos testeando la desigualdad de las pendientes obtenidas. Estos estudios con sus gráficos fueron efectuados mediante el programa Graph Pad Prism (versión 2.0).

Comparaciones entre tratamientos mediante análisis de varianza de un factor: En los estudios de reversión de la inhibición proliferativa por antagonistas histamínicos, quimiotaxis, e inmunomarcación, los diferentes grupos de tratamiento fueron comparados mediante un análisis de varianza de un factor. En los ensayos de migración celular se analizaron los logaritmos naturales de los recuentos celulares y en los de inmunomarcación, las diferencias entre intensidades de fluorescencia media. De hallarse diferencias significativas, se efectuó un post test de Bonferroni, para evaluar que grupos fueron disímiles entre sí.

Análisis de las curvas dosis-respuesta: En aquellos casos en que la respuesta con droga -analizada mediante ANOVA de un factor- fue significativamente diferente al control, se estudió el ajuste de los resultados obtenidos a 2 tipos de curvas dosis-respuesta (CDR) sigmoideas mediante un análisis de regresión no lineal, empleando el programa Graph Pad Prism (versión 2.0). Se optó por la ecuación más sencilla, salvo que la otra mejorara el ajuste en forma significativa. Se analizaron también con esta metodología los ensayos de desensibilización del receptor H_2 y del estímulo de la adenilciclasa por forskolina. En estos casos los tiempos de preincubación con la droga desensibilizante fueron las "dosis" del tratamiento.

En los estudios de Northern blot para c-fos y c-myc, se calcularon los valores de CE_{50} y R_{max} por análisis gráfico de las curvas de concentración-respuesta. Se empleó el test "t" de Student para las comparaciones.

Para todos los estudios estadísticos se tomó como nivel de significación un $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Receptores a histamina en células hemopoyéticas humanas: se colectaron y estudiaron 18 muestras -15 de médula ósea y 3 de sangre periférica- pertenecientes a 15 pacientes: 14 eran portadores de una L.A. y el restante presentaba una anemia ferropénica (control). Los tipos de L.A.M. estudiados fueron: M_0 (1 pte.); M_1 (3); M_2 (2); M_3 (3); y M_4 (2). En las 3 L.A.L., 1 fue T, otra de estirpe B común, y la 3ª nula.

El momento evolutivo de la enfermedad al extraerse las muestras era

-Previo a la inducción: 8 muestras

-Remisión completa: 3 muestras

-Recaída medular: 4 muestras

-Recaída extramedular (en remisión hematológica): 1 muestra.

En todas las muestras se detectaron sitios de unión específica a histamina (SUEH) de tipo H_2 . En los estudios con histamina tritiada (10 primeras muestras) se detectó un aumento significativo de su concentración en los especímenes con enfermedad activa, respecto a los de pacientes en remisión hematológica ($P = 0,0368$, test U de Mann-Whitney). En las 13 muestras estudiadas mediante unión de pirilamina tritiada, también hubo una mayor concentración de S.U.E.H. tipo H_2 en las muestras de pacientes con enfermedad activa, pero sin alcanzar niveles de significación ($P = 0,4542$).

Los estudios de correlación no paramétrica mostraron una ausencia de asociación entre el porcentaje de blastos presente en las muestras estudiadas y el

nivel de S.U.E.H. de tipo H_1 medido por cualquiera de los 2 radioligandos. En cambio sí se halló una correlación positiva significativa entre el nivel de S.U.E. a pirilamina de la muestra y el porcentaje de células mononucleares CD34 positivas ($R_s = 0,98314$. $P < 0,03$).

Por otra parte, salvo en una paciente con una L.A.M. M_0 , se detectaron S.U.E.H. de tipo H_2 en las restantes muestras estudiadas. No hubo diferencias significativas, en la concentración de S.U.E. a los 2 radioligandos empleados (histamina y tiotidina tritiada) entre los pacientes con enfermedad activa y en remisión hematológica. Tampoco se halló correlación significativa entre el nivel de S.U.E.H. de tipo H_2 , por un lado, y el inmunofenotipo, o el porcentaje de blastos de las células mononucleares por otro lado.

En conclusión:

- I. Fueron detectados S.U.E.H. de tipo H_1 en todas las muestras de pacientes con L.A.
- II. Su nivel de expresión podría estar asociado con la proporción y grado de inmadurez de las células leucémicas presentes en la muestra.
- III. Fueron detectados S.U.E.H. de tipo H_2 en todas las muestras de pacientes con L.A., excepto en 1 L.A.M. M_0 .

Receptores a histamina H_2 en la Línea celular U-937: los estudios de binding con tiotidina tritiada mostraron que las células U-937 presentan un S.U.E. a histamina de tipo H_2 (Fig. 1). Los parámetros calculados en base a los datos experimentales son una constante de disociación (K_d) = $15,2 \pm 3,5$ nM y una densidad de sitios de unión (Q) = 18.857 ± 1636 sitios por célula.

La histamina y los agonistas H_2 inducen la elevación de los niveles intracelulares de AMPc -ver tabla I-. La histamina es la droga más eficaz, con un aumento máximo de la concentración de AMPc de 56 veces por sobre el nivel basal a una concentración 10 mM. El dimaprit y el BU-E-75, a una concentración 10 mM,

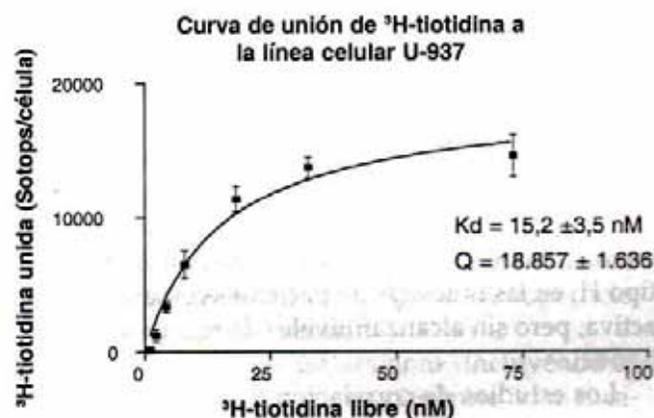


Fig. 1 Curva de saturación de las células U-937 con tiotidina tritiada.

TABLA I. Potencia de diferentes agonistas histamínicos para elevar el AMPc en las células U-937

DROGAS	CE ₅₀ (mM)
Histamina	1,8
Dimaprit	2,8
BU-E-75	0,2

desencadenan una R_{max} consistente en un incremento del AMPc basal de 38 veces.

El agregado de pirilamina (antagonista H_1) determinó una leve reducción -del 30%- de la eficacia de la histamina y no modificó el efecto de los agonistas H_2 . En cambio, el agregado de famotidina (antagonista H_2) suprimió el incremento del AMPc generado tanto por los agonistas H_2 como por histamina, confirmando la especificidad del estímulo H_2 para elevar el AMPc.

Estudios de proliferación U-937 con drogas histamínicas: se evaluó en 2 oportunidades, mediante el test de MTT, la proliferación celular en presencia de histamina en un rango de concentraciones que osciló entre 10^{-9} M y 10^{-5} M. No se observaron diferencias significativas con la proliferación media del control. A una concentración de 10^{-4} M la histamina, en 2 experimentos sucesivos de cinética celular, tampoco modificó la proliferación U-937.

Los agonistas específicos H_2 fueron estudiados en un rango de concentraciones entre 10^{-7} y 10^{-4} M. Ambos agonistas (BU-E-75 y dimaprit) produjeron una inhibición significativa de la replicación celular (manifestado como un descenso de la DO media) a concentraciones de 25 y 100 μ M, no revertida por el agregado de antagonistas específicos. Más aún, las concentraciones más altas de antagonistas potenciaron el efecto antirreplicativo y citotóxico de los agonistas, por lo que se concluye que dicho efecto no está mediado por la activación específica de los receptores.

Estudios de diferenciación U-937 con agonistas H_2 : se empleó, en estos estudios, una concentración final de histamina y de agonistas H_2 (BU-E-75 o dimaprit) de 100 μ M.

Ni la histamina ni los agonistas sintéticos -en 2 experimentos sucesivos- produjeron cambios en el tamaño celular, medido por la dispersión anterógrada (forward scatter) del haz de láser. La histamina tampoco produjo cambios, pero ambos agonistas determinaron un pequeño aumento de la dispersión a 90° de la luz (side scatter) en los 2 experimentos, sin alcanzar significación estadística. Por microscopía convencional dicho cambio correspondió a un aumento en la vacuolización citoplasmática.

En ambos experimentos no hubo cambios en el porcentaje de células que expresan CD14 -siempre

inferior al 1%, ni aumentos en la expresión de CD11b inducidos por histamina o por los agonistas H_2 .

Modificaciones en los niveles de ARNm de c-fos inducidas por los agonistas H_2 : Las células U-937 tratadas con histamina o dimaprit 10 μ M mostraron un aumento transitorio en los niveles del ARNm de c-fos después de 30 minutos de incubación. El análisis cuantitativo de este ensayo mostró niveles máximos de ARNm a los 60 minutos, que posteriormente disminuyeron, llegando a valores próximos a los basales tras 4 horas de tratamiento. Experimentos similares desarrollados en presencia de agonista H_1 10 μ M no mostraron efectos en los niveles de ARNm de c-fos. Los niveles de transcripción de la GAPD -utilizada como control- fueron esencialmente constantes en todos los ensayos (Fig. II).

Estudio dosis-respuesta de los efectos de la histamina y de los agonistas H_1 y H_2 en los niveles de ARNm de c-fos: Las curvas concentración-respuesta fueron obtenidas tras una incubación de 1 hora, tras determinarse en el estudio previo que 60 minutos era el tiempo de respuesta máxima, en presencia de histamina o del agonista H_2 . Ambos agentes induje-

ron aumentos dosis-dependientes en los niveles de ARNm de c-fos. Los valores de CE_{50} y R_{Max} fueron obtenidos por análisis densitométrico de los autorradiogramas. Los valores de CE_{50} para histamina y dimaprit fueron $1,4 \pm 0,3 \mu$ M y $0,6 \pm 0,1 \mu$ M, respectivamente, mientras que la respuesta máxima se obtuvo a concentraciones superiores a 10 μ M para ambos reactivos. Nuevamente, no se observaron cambios en las células tratadas con el agonista H_1 (Fig. III).

Caracterización de los receptores involucrados en la elevación del ARNm de c-fos: sólo los receptores de tipo H_2 están relacionados directamente con los aumentos en los niveles de c-fos. Los efectos de la histamina y del agonista H_2 fueron bloqueados totalmente por famotidina, mientras que con pirilamina no se vieron cambios. Ni la pirilamina ni la famotidina alteraron, per se, los niveles de c-fos (Fig. IV).

Estudio de las kinasas involucradas en la elevación del ARNm de c-fos inducido por el estímulo H_2 : para investigar si la fosforilación de proteínas está involucrada en el mecanismo de modulación de c-fos, se efectuaron una serie de experimentos en los que el H_2 , un inhibidor específico de PKA y PKC⁽²³⁾, fue aña-

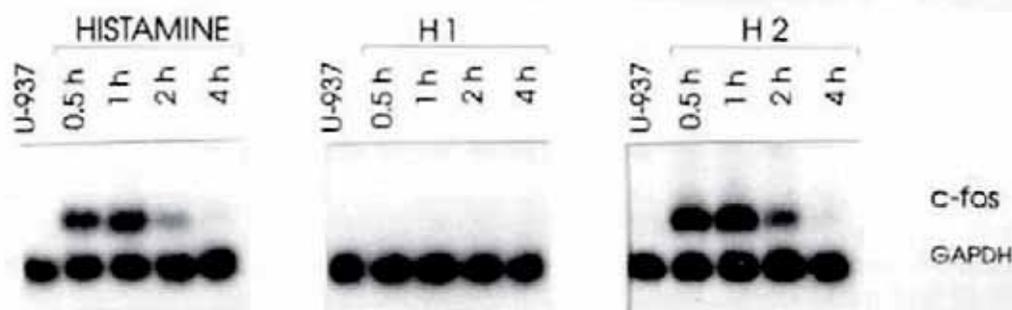


Figura II. NORTHERN BLOT de C-FOS con HISTAMINA, AGONISTAS H_1 y H_2 .



Figura III. NORTHERN BLOT de c-fos con DIFERENTES CONCENTRACIONES de HISTAMINA, AGONISTAS H_1 y H_2 .

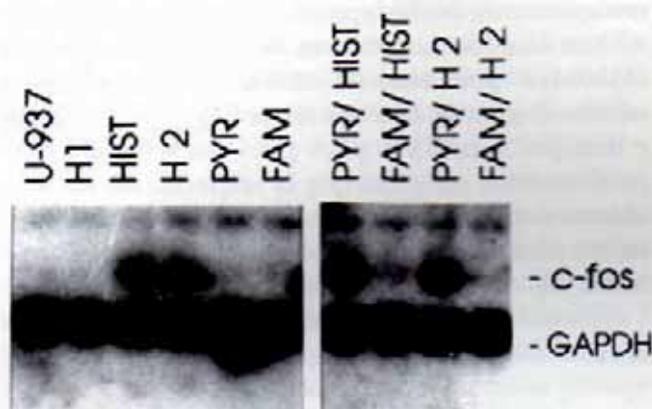


Figura IV. NORTHERN BLOT de *c-fos* con AGONISTAS Y ANTAGONISTAS HISTAMINICOS

dido en forma previa al agregado de histamina o del agonista H_2 al cultivo de células U-937. H_7 bloqueó el aumento en los niveles de ARNm de *c-fos* inducidos tanto por histamina como por dimaprit. Además el DBAMPc, un activador de la PKA, indujo una elevación de los niveles de transcripción de *c-fos* que pudieron ser bloqueados por H_7 . La bisindolilmaleimida, un inhibidor específico de la PKC⁽²⁴⁾, no modificó la expresión de *c-fos* inducida por histamina o dimaprit, pero en cambio abolió el aumento de ARNm de *c-fos* inducido por PMA, un conocido activador de la PKC⁽²⁵⁾ (Fig. V). Estos resultados sugieren que la fosforilación de proteínas mediada por PKA interviene en la expresión del gen *c-fos* inducida por histamina.

Estudio del efecto de las drogas histamínicas en los niveles de ARNm de *c-myc*: Las células U-937 expresan constitutivamente el gen *c-myc*. Sus niveles de expresión fueron estudiados tras el agregado de una concentración 10 μ M de histamina, agonista H_1 o agonista H_2 . No se observaron variaciones en los ni-

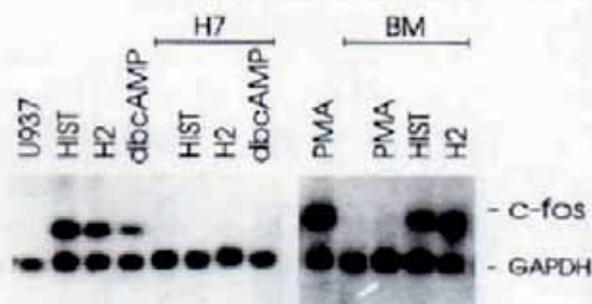


Figura V. NORTHERN BLOT de *c-fos* con AGONISTAS HISTAMINICOS y DBAMPc. EFECTOS de los ANTAGONISTAS de PROTEIN KINASAS H_7 y B.I.M.

veles de expresión de este oncogén en períodos de tiempo que oscilaron entre 1 y 48 horas (Fig. VI). Tratamientos más prolongados de hasta 6 días arrojaron resultados similares (no se muestran los resultados).

Estudio del efecto del dibutilil AMPc en los niveles del ARNm de *c-fos* y *c-myc*: Cultivos de células U-937 fueron suplementados por varios períodos de tiempo con DBAMPc 400 μ M, tras lo cual se estudiaron los niveles de ARNm de *c-fos* y *c-myc*.

El DBAMPc produjo un marcado incremento de los niveles de transcripción de ARNm de *c-fos* dentro de la primera hora y estos niveles permanecieron elevados durante al menos 12 horas de exposición a la droga. Este efecto sostenido no fue observado con el empleo de histamina o del agonista H_2 . Bajo condiciones similares, los niveles de ARNm de *c-myc* se redujeron marcadamente dentro de la 1ª hora de tratamiento con DBAMPc (Fig. VII).

Variaciones de los niveles de las proteínas Fos y Myc en las células U-937 tratadas con el agonista H_2 y con dibutilil AMPc: En células tratadas con dimaprit o con DBAMPc se realizaron estudios cinéticos del contenido de proteína Fos y Myc. Se halló que la traducción proteica es paralela a los niveles correspondientes de ARNm de los oncogenes. El dimaprit produjo un aumento transitorio en la proteína Fos con una respuesta máxima a las 2 horas de incubación, que permaneció más elevada que los controles por al menos 6 horas y que disminuyó progresivamente hasta las concentraciones basales tras 12 a 24 horas. En cambio, los niveles de esta proteína permanecieron constantemente elevados en las células expuestas por hasta 24 horas al DBAMPc. Los niveles de proteína Myc no fueron modificados por acción del dimaprit en las células tratadas por hasta 24 horas, pero mostraron un descenso progresivo cuando las células fueron cultivadas en presencia de DBAMPc. El estudio de los niveles de la proteína Jun mostró un comportamiento similar al de los niveles de la proteína Fos en las células tratadas con dimaprit o con DBAMPc (Fig VIII).

El DBAMPc estimula a la PKA y es capaz de diferenciar las células U-937^{(19),(20)}. Los agonistas H_2 , que estimulan la misma vía de transducción de señales son, en cambio, incapaces de diferenciar esta línea celular y generan una respuesta de oncogenes con una elevación transitoria del ARNm y de la proteína Fos, sin modular el gen *c-myc*. Se decidió poner a prueba si el receptor H_2 , por desensibilización, podría estar generando una señal de limitada duración, incapaz de diferenciar estas las células.

Estudio de la cinética de desensibilización del receptor H_2 : Los resultados mostraron una reducción en la producción de AMPc por el agonista H_2 cuando las células U-937 fueron tratadas previamente con BU-E-75. Tras 2 horas de incubación con BU-E-75 10 μ M, la

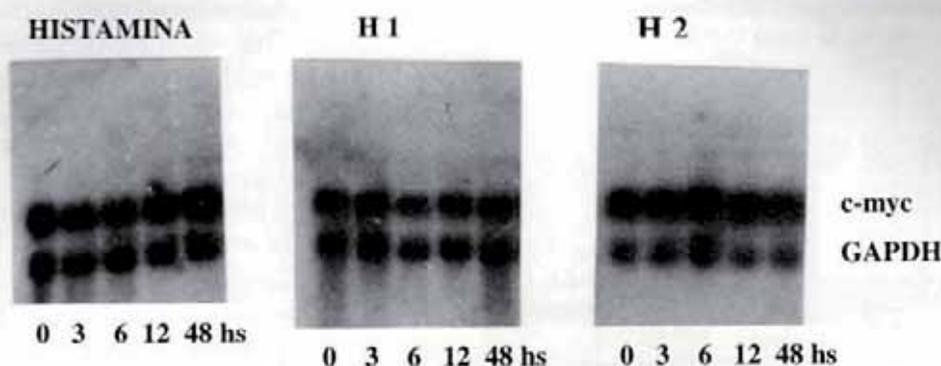


Figura VI. NORTHERN BLOT de *c-myc* con AGONISTAS HISTAMÍNICOS

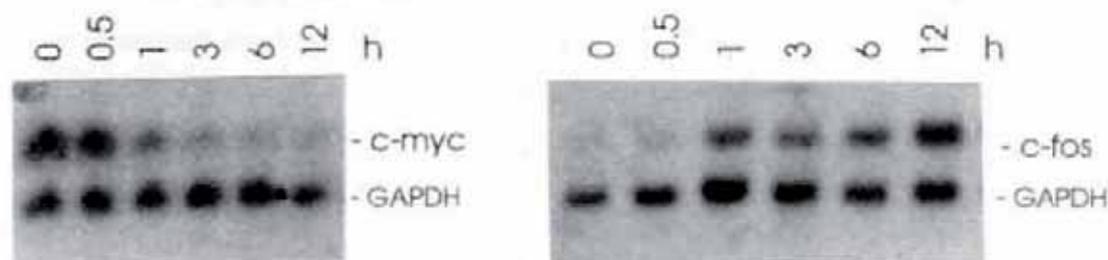


Figura VII. NORTHERN BLOT de *c-fos* y *c-myc* en CELULAS U-937 con DBAMPc

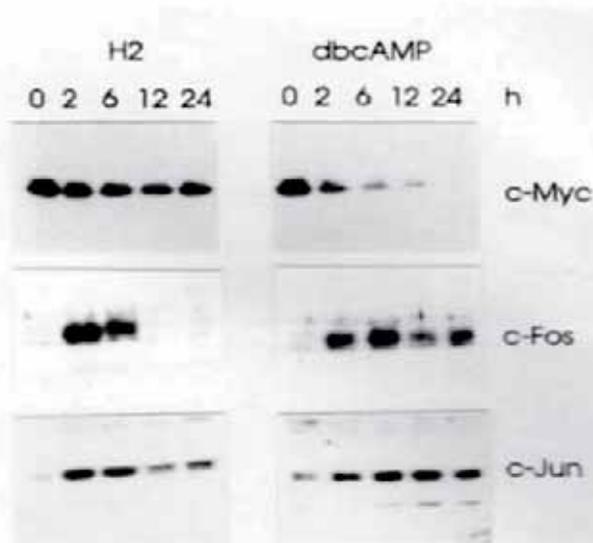


Figura VIII. WESTERN BLOT de FOS, JUN y MYC con DIMAPRIT y DBAMPc

reestimulación H_2 no indujo elevación alguna del AMPc. A los 20 ± 3 minutos de pretratamiento se observó el 50% de la desensibilización máxima. Para establecer si la desensibilización se limitaba a los re-

ceptores H_2 , se estudiaron los efectos del pretratamiento con BU-E-75 sobre la respuesta de los receptores a PGE_2 y de la adenil ciclasa a la forskolina. La PGE_2 eleva los niveles de AMPc en la línea U-937 en forma dosis-dependiente, con una CE_{50} de 40 nM. La forskolina también origina un incremento dosis-dependiente del AMPc (ver más adelante). El pretratamiento con BU-E-75 no alteró la respuesta a la PGE_2 ni a la forskolina, lo que pone en evidencia que la desensibilización del receptor H_2 es un fenómeno homólogo (Fig IX).

Se buscó evaluar si otros agentes, activos en distintos sitios de la vía de transducción de señales del receptor H_2 , eran capaces de generar una estimulación prolongada de la adenilciclasa e inducir la diferenciación celular. Se eligió la forskolina por ser un estimulador directo de la adenilciclasa, menos proclive por ello a sufrir fenómenos de desensibilización.

Estudio de la desensibilización del estímulo mediado por forskolina: tanto la forskolina como el dimaprit indujeron niveles similares de AMPc en células U-937 no tratadas previamente. La exposición previa a forskolina determinó un descenso en la producción de AMPc en respuesta al agonista H_2 , al punto que tras 4 horas de incubación con forskolina, el estímulo con dimaprit no generó elevación del AMPc. Esta

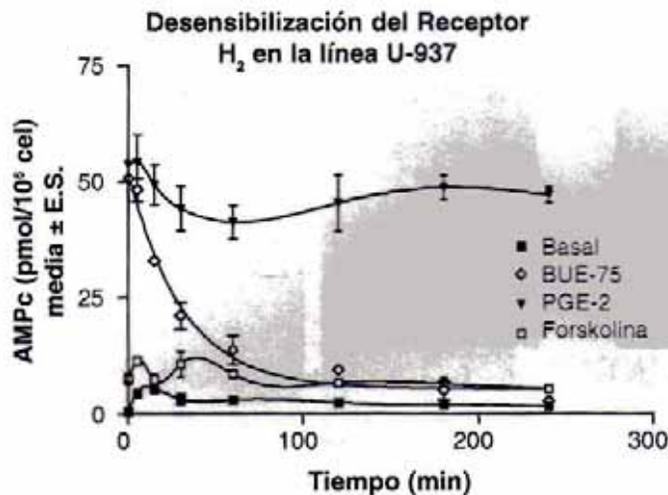


Fig. IX Cambio en los niveles de AMPc en las células U-937 tratadas con dimaprit y reestimuladas con distintos agentes

Las células U-937 fueron incubadas con BU-E-75 10 μ M por los períodos de tiempo indicados, lavadas y estimuladas con BU-E-75 10 μ M, PGE₂ 1 μ M y forskolina 10 μ M. Los niveles de AMPc fueron luego determinados como se detalla en métodos.

desensibilización heteróloga del receptor H₂ mostró un tiempo medio ($T_{1/2}$) de 120 ± 13 minutos (media \pm error estándar de la media) medido en 4 experimentos.

Por otro lado la reexposición de las células U-937 a forskolina 75 μ M tras una incubación de hasta 24 horas siguió desencadenando una elevación del AMPc proporcionalmente similar a la originada en células no tratadas (ver figura X), lo que confirma la ausencia de desensibilización homóloga del estímulo mediado por forskolina.

Estudio dosis-respuesta de AMPc a forskolina: La forskolina indujo un aumento inmediato en el contenido de AMPc celular en la línea U-937 en forma concentración-dependiente, con una $CE_{50} = 30,7 \mu$ M y una respuesta máxima a una concentración 100 μ M, con niveles de 45,3 picomoles de AMPc/10⁶ células, o sea 10 veces superiores a los basales (Fig XI).

Respuesta proliferativa de la línea U-937 a la forskolina: La forskolina, en todos los ensayos efectuados, inhibió en forma dosis dependiente la proliferación celular U-937. La CE_{50} fue de 22 μ M y la respuesta máxima -ver Fig XII- se obtiene a concentraciones superiores a 50 μ M con una inhibición del 83,3% de la proliferación control.

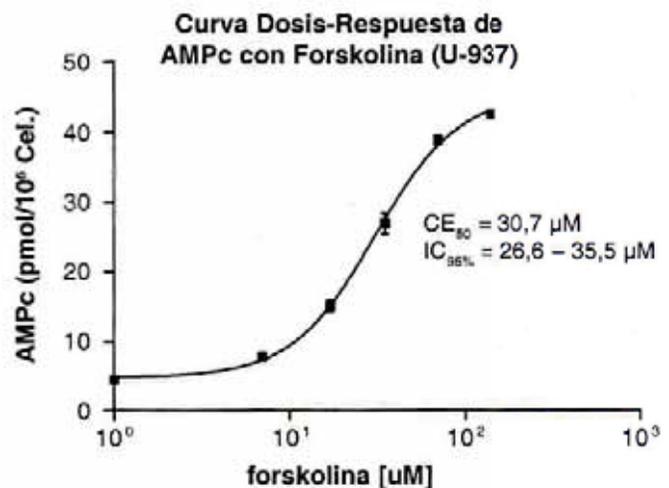


Fig. XI Curva dosis de forskolina-respuesta de AMPc en células U-937.

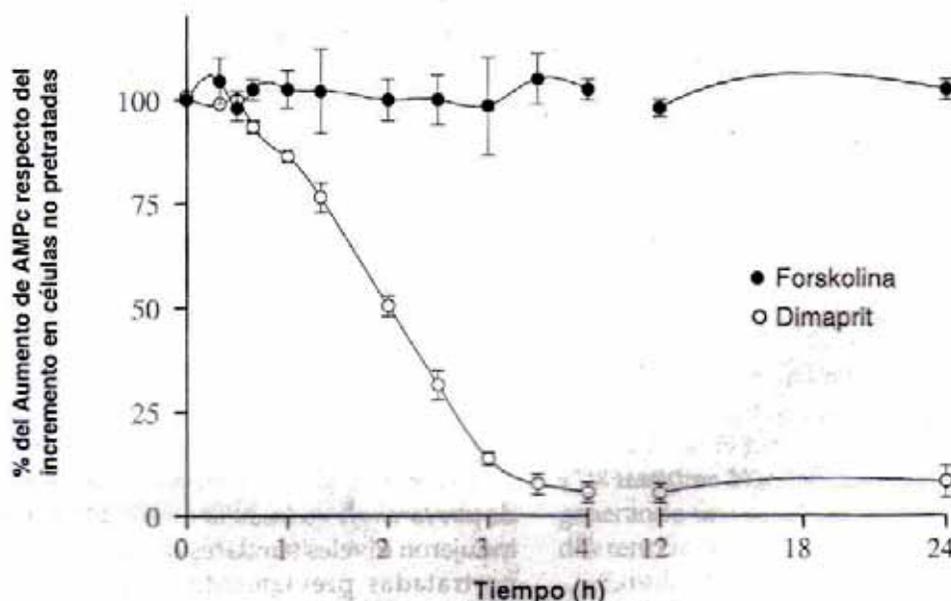


Fig. X Cambio en los niveles de AMPc en las células U-937 tratadas con forskolina y reestimuladas con forskolina o dimaprit

Las células U-937 fueron incubadas con forskolina 75 μ M por los períodos de tiempo indicados, lavadas y estimuladas con dimaprit 10 μ M o forskolina 75 μ M. Los niveles de AMPc fueron luego determinados como se detalla en métodos.

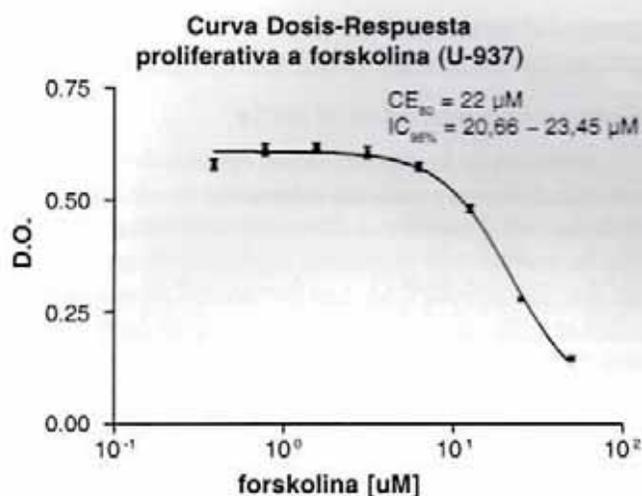


Fig. XII. Proliferación U-937 con forskolina.

Respuesta proliferativa al DBAMPc: El DBAMPc produjo también una inhibición proliferativa dosis dependiente, con una CE₅₀ = 116 μ M, y una respuesta máxima con inhibición del 82% de la proliferación control a una concentración 1 mM.

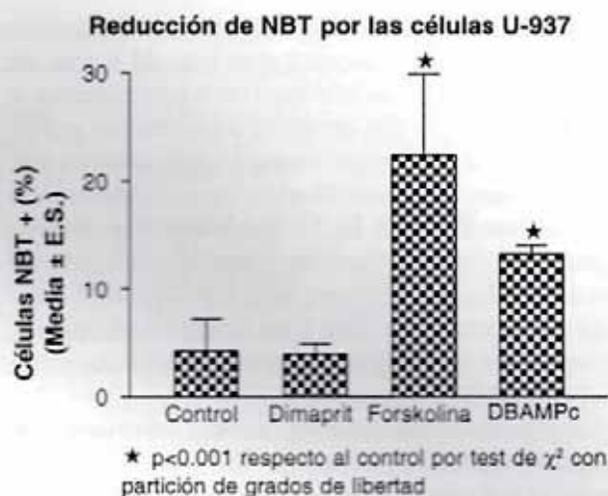


Fig. XIII. Proporción de células U-937 que reducen NBT.

Estudios de diferenciación U-937 con agonistas H_2 , forskolina y DBAMPc

En estos estudios, las concentraciones de droga ensayadas fueron 75 μ M con dimaprit, 75 μ M con forskolina y 500 μ M con DBAMPc y el tiempo de cul-

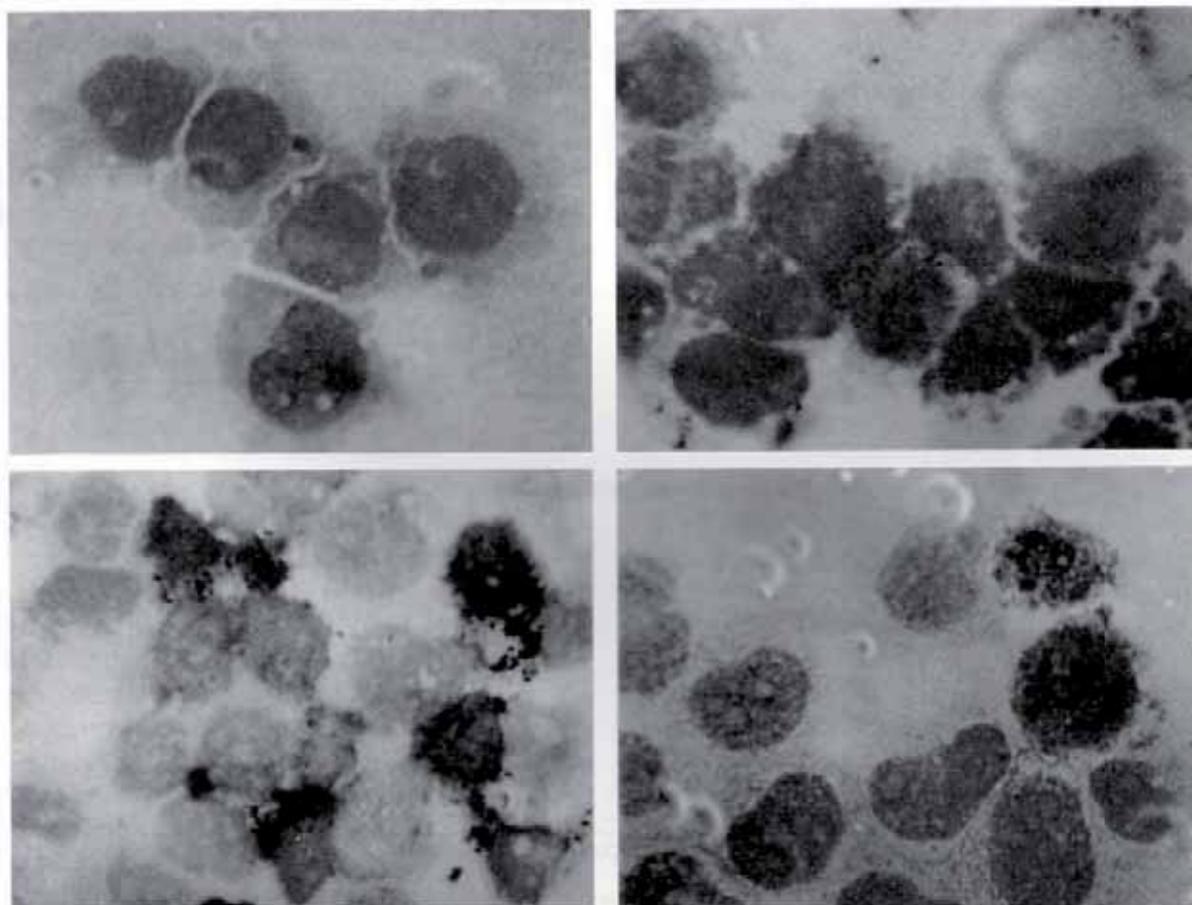


Figura XIV. REDUCCION DE NBT: a.Control b.Dimaprit c.Forskolina d.DBAMPc.
Tinción con May Grunwald-Giemsa (x 1.000)

tivo fue de 72 horas. Como un experimento de cinética celular proliferativa mostró que tras 48 horas de incubación con forskolina las células comienzan a replicarse nuevamente, en dicho momento se procedió a cambiarles el medio, resuspendiéndolas en medio fresco con forskolina 75 μ M.

Reducción del NBT: En 3 experimentos se observó un aumento moderado pero significativo en la proporción de células que reducen NBT con DBcAMP y especialmente con forskolina. Con dimaprit, en cambio, la proporción de células que reducen NBT fue similar al control (ver figura XIII).

Las siguientes fotos corresponden a un experimento representativo. Las células U-937 control prácticamente no reducen NBT, al igual que las células tratadas con agonista H_2 . Las células tratadas con DBAMPc

y especialmente con forskolina reducen NBT en una proporción fácilmente visualizable (Fig XIV).

Respuesta quimiotáctica al rhC5a

Selección de la concentración óptima de rhC5a: Un estudio dosis-respuesta de migración de células U-937 tratadas con forskolina a diferentes concentraciones de rhC5a mostró una respuesta significativa en un rango de 10^{-6} a 5×10^{-10} M. Los recuentos celulares más altos se obtuvieron a una concentración de rhC5a de 5×10^{-9} M y especialmente con el reemplazo del medio de cultivo y forskolina por medio y droga frescos a las 48 horas del tratamiento de diferenciación -barra FF5- (Fig. XV).

Por consiguiente, se empleó 5×10^{-9} M de rhC5a y este tratamiento diferenciante con forskolina en los experimentos sucesivos.

Respuesta quimiotáctica al rhC5a: Las células tratadas con forskolina y con DBAMPc presentaron altas respuestas migratorias cuando fueron enfrentadas con rhC5a 5×10^{-9} M. Las células control y las tratadas con dimaprit en cambio casi no migraron al ser expuestas al quimioattractante. En todos los casos, en ausencia de rhC5a sólo se obtuvieron recuentos marginales de células migradas (Fig. XVI).

Modulación de los antígenos mieloides de superficie: El DBAMPc indujo un aumento moderado pero significativo en la expresión de 2 marcadores mieloides en las células U-937, el CD11b (subunidad α de la integrina b_2 , Mac-1) y el CD14 -receptor para el complejo de lipopolisacárido (LPS) y LPS binding protein (LBP)- un marcador específico monocitario. El incremento en la expresión de dichos antígenos inducida por forskolina, en ambos casos, no alcanzó un nivel significativo -ver tabla II-.

Modificaciones en los niveles de la proteína Myc inducidas por forskolina: En células U-937 tratadas

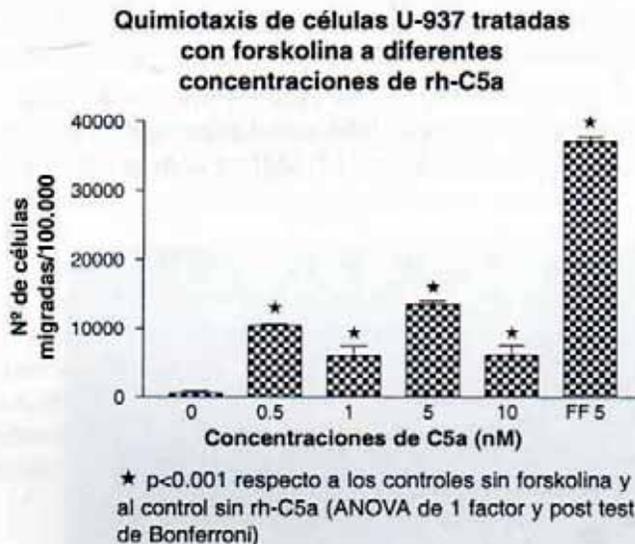


Fig. XV. Respuesta quimiotáctica de las células U-937 tratadas con forskolina a diferentes concentraciones de rhC5a.

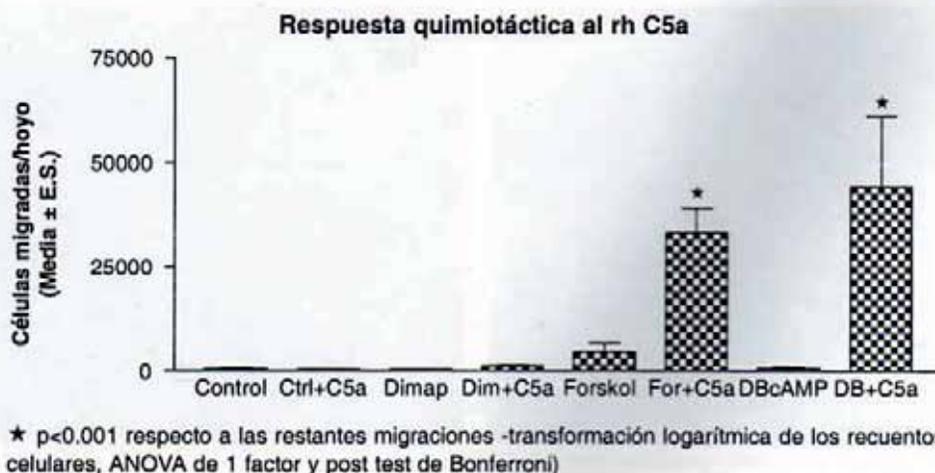


Fig. XVI. Respuesta quimiotáctica de las células U-937 con diferentes tratamientos y enfrentadas a rhC5a.

TABLA II. Cambios en la expresión de antígenos mieloides de superficie

	CD11b		CD14	
	Diferencia de I. F. M. (media ± E.S.)	% de células positivas (media ± E.S.)	Diferencia de I. F. M. (media ± E.S.)	% de células positivas (media ± E.S.)
CONTROL	16,54 ± 2,73	34,9 ± 5,05	0,61 ± 1,24	6,3 ± 3,35
AGONISTA H ₂	19,95 ± 5,02	37,3 ± 3,42	2,2 ± 3,57	8,5 ± 7,47
FORSKOLINA	25,69 ± 3,01	60,39 ± 12,58	7,65 ± 2,27***	18,43 ± 13,03
DBAMPc	39,32 ± 3,01*	68,7 ± 1,74**	14,71 ± 3,98****	25,5 ± 4,51*****

*P<0,002 **P<0,001 ***P<0,04 ****P<0,006 *****P<0,02 respecto al control (test de T para muestras independientes)

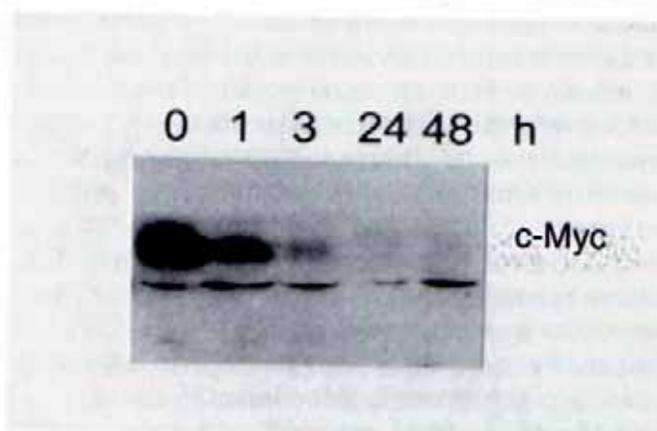


Figura XVII. WESTERN BLOT de MYC en CELULAS U-937 con FORSKOLINA

con forskolina a una concentración 75 μ M se efectuaron estudios cinéticos de los niveles de proteína Myc. Se observó que ya a la hora de incubación los niveles de Myc descendieron marcadamente, volviéndose indetectable después de las 3 horas de tratamiento, en coincidencia con lo ocurrido con el dibutilil AMPc (ver Figura XVII).

DISCUSIÓN

La veloz expansión del conocimiento sobre los mecanismos que conducen a la transformación maligna celular, gracias a las técnicas de biología molecular y a la disponibilidad de modelos celulares "in vitro" y de modelos murinos "in vivo", están revolucionando nuestra comprensión sobre las hemopatías malignas. El probable corolario de estos avances es que, en un futuro mediano, veamos un cambio sustancial en las terapéuticas hoy disponibles para su tratamiento.

Las LLA pediátricas fueron las primeras enfermedades malignas en obtener beneficios temporarios del tratamiento con corticoides y quimioterápicos⁽²⁾. Posteriormente, con la asociación de varias de estas drogas entre sí, combinadas en regímenes más agre-

sivos, de mayor duración y más eficacia, se consiguieron altas tasas de curación⁽²¹⁾. La administración de estas terapéuticas en pacientes adultos no reprodujo el éxito pediátrico, ya que sólo una minoría consigue una sobrevida prolongada^{(22)/(23)}. El tratamiento de las LMA se benefició también, aunque en menor medida, de la aparición de la poliquimioterapia, ya que sólo se logra la sobrevida prolongada de menos del 20% de los pacientes⁽²⁴⁾.

Estos resultados, obtenidos con tratamientos basados en el empleo de citostáticos y el trasplante de médula ósea, han mejorado relativamente poco en la última década. La mayoría de los pacientes sigue hoy falleciendo a consecuencia de estas enfermedades.

En este contexto despertó enorme interés el advenimiento del tratamiento diferenciador con ácido transretinoico en los pacientes con APL. Si bien originalmente fue un hallazgo empírico de investigadores chinos⁽²⁵⁾, corroborado luego por estudios efectuados en Occidente^{(26)/(27)}, la detección del rearreglo del gen RAR α en todos los casos de APL, la descripción posterior de los integrantes del complejo correpressor nuclear y de su disociación por acción del ATRA, permitieron comprender tanto el probable mecanismo de transformación, como la acción terapéutica de las dosis farmacológicas del ATRA⁽²⁸⁾.

Los estudios sobre la fisiopatogenia, respuesta a distintos estímulos químicos y requerimientos para la supervivencia y diferenciación de los progenitores hemopoyéticos leucémicos se vieron obstaculizados por las dificultades que plantea cultivar células leucémicas mieloides "in vitro" por largos períodos. Las células leucémicas primarias constituyen una población heterogénea, compuesta por subpoblaciones celulares con diferentes potencialidades de autorrenovación, replicación y diferenciación terminal⁽²⁹⁾, en las que sólo un pequeño número posee la capacidad de perpetuar y reproducir la enfermedad.

La obtención de líneas celulares mieloides humanas a partir de pacientes con LMA permitió desarrollar estudios en células originadas en los mismos pro-

genitores transformados, pero de mayor homogeneidad en sus propiedades proliferativas y de diferenciación, e inmortalizadas, respecto a las células leucémicas primarias, lo que las constituye en un modelo "in vitro" mucho más conveniente. Por lógica, la mejor adaptación de estas líneas celulares para la investigación en laboratorio supuso una serie de modificaciones genéticas, respecto al modelo leucémico original, con activación de nuevos oncogenes⁽³⁰⁾ e inactivación de genes supresores tumorales⁽³¹⁾, lo que atenúa la posibilidad de generalizar los resultados obtenidos a las células leucémicas originales.

La línea celular U-937 ha constituido uno de los modelos "in vitro" más importantes para el estudio de la diferenciación monocito-macrofágica en células leucémicas⁽¹²⁾ y por ello fue elegida para el presente trabajo, ya que su diferenciación es inducible por numerosos estímulos farmacológicos⁽¹²⁾.

Se desconocía, al inicio del presente trabajo, si las células leucémicas primarias poseen receptores para histamina de tipo H_1 y/o H_2 . Por estudios de estimulación con histamina, bloqueo con antagonistas específicos y dosaje de AMPc, se había establecido que las líneas celulares HL-60, U-937 y THP-1 expresan receptores H_2 ^{(34),(35),(36)}, al igual que los granulocitos⁽³⁷⁾. Un único trabajo en LA sugería la presencia de receptores a histamina, acoplados a la síntesis de AMPc, en las LLA y en una minoría de las LMA con componente monocitario⁽³⁸⁾. Mediante estudios de unión con radioligandos, hemos detectado la presencia de sitios de unión específica, tanto H_1 como H_2 , en casi todas las muestras de pacientes con LA, independientemente de la proporción de células leucémicas presente en las muestras. Esto sugiere, por un lado, que la presencia de estos receptores es un hecho común en todos los tipos de LA y, por otro, que las células hemopoyéticas normales también los expresan. Para profundizar sobre un eventual rol de estos receptores en la proliferación y/o diferenciación celular, se estudió la línea U-937 como modelo de progenie monocitaria leucémica.

Los ensayos de unión a radioligandos permitieron caracterizar los receptores a histamina H_2 en las células U-937. En la mayoría de los tejidos y líneas celulares, los receptores H_2 , vía una proteína Gs, estimulan la adenil ciclasa. Por esta razón, se estudió en la línea celular U-937 los niveles de AMPc en respuesta a la histamina.

Nuestros resultados experimentales indican que la histamina produce un incremento en los niveles de AMPc mediado a través de los receptores H_2 , ya que el aumento del AMPc fue bloqueado por antagonistas H_2 y sólo disminuyó en muy pequeña proporción por la presencia de antagonistas H_1 . Asimismo, los agonistas selectivos H_2 produjeron un aumento del AMPc dependiente de la dosis empleada, sin alcan-

zar los valores máximos de AMPc inducidos por histamina, lo que indica que poseen menor eficacia. En cambio, el agonista H_1 sólo aumentó los niveles basales de AMPc, en forma marginal, a las más altas dosis utilizadas.

Los reiterados estudios concentración-respuesta mostraron que ninguno de los agonistas histamínicos produjo algún efecto significativo sobre la proliferación celular U-937 a concentraciones en que sí estimularon la síntesis de segundos mensajeros. Por lo tanto, la estimulación de los receptores histamínicos H_2 no altera la proliferación celular U-937. Sin embargo, a muy altas concentraciones (≥ 25 mM) los agonistas semisintéticos H_2 , pero no la histamina, inhibieron en forma no específica la proliferación U-937. Dado que la diferenciación en las líneas celulares se asocia con inhibición de la proliferación celular⁽³⁹⁾, resultó de interés averiguar si este freno proliferativo era una manifestación de diferenciación monocitaria. Los agonistas semisintéticos H_2 produjeron un pequeño aumento en la dispersión del haz de láser a 90° y un descenso en la baja expresión basal de CD11b. Este último cambio es opuesto al esperable para una diferenciación a monocito-macrofago. El aumento de la dispersión lateral de la luz, por su parte, fue consecuencia del incremento del contenido de vacuolas citoplasmáticas -hecho que se visualizó al microscopio óptico- y no de la aparición de un nuevo tipo de gránulos por maduración celular. Se concluye, por lo tanto, que la inhibición de la proliferación celular por altas concentraciones de agonistas histamínicos semisintéticos H_2 no se acompaña de cambios propios de la diferenciación monocitaria.

En cuanto a las respuestas nucleares, al analizar la expresión del proto-oncogén c-myc en células U-937 tratadas con histamina o sus agonistas, no se observaron variaciones de los niveles de ARN mensajero ni de proteína, aún con tratamientos prolongados y con altas dosis, lo que refuerza el hallazgo de que el estímulo H_2 no es capaz "per se" de inhibir la proliferación ni diferenciar las células U-937.

Tanto la histamina como el agonista H_2 dimaprit, pero no el agonista H_1 , incrementaron transitoriamente los niveles de ARNm de c-fos y de la proteína Fos. Con la ayuda de antagonistas específicos se confirmó que dicha respuesta está mediada por receptores H_2 . Las CE_{50} para la producción de AMPc y para la expresión del proto-oncogén c-fos, tanto de histamina como de dimaprit, fueron similares, lo que sugiere que el AMPc podría estar involucrado en la expresión de c-fos, vía receptor H_2 . Reforzando la hipótesis sobre la participación del AMPc en la regulación de dicho gen, se ha descrito el aumento en la expresión de c-fos en células HL-60 y U-937 tratadas con inhibidores de fosfodiesterasas⁽⁴⁰⁾.

La inducción del proto-oncogén *c-fos* mediada por dimaprit fue atenuada por un inhibidor de PKA. El inhibidor utilizado, H7, no es específico de PKA, sino que también actúa sobre la PKC. El agregado de bisindolilmaleimida, un inhibidor específico de la PKC, no modificó la inducción de *c-fos* por histamina o por el agonista H_2 , indicando que la PKC no está involucrada en la regulación de este gen. Se concluye que es la vía del receptor H_2 -AMPc-PKA, la que modula la expresión de *c-fos*.

La inducción de *c-fos* por AMPc fue demostrada en diversos sistemas, aunque las características de este control son dependientes del tipo celular, como lo muestran la significativa y estable transcripción del gen *c-fos* en macrófagos estimulados con AMPc y el efecto más débil y transitorio en otros sistemas⁽⁴¹⁾. Incrementos en la expresión de *c-fos* asociados a un aumento en los niveles de AMPc intracelulares se describieron en sistemas donde este nucleótido cíclico induce proliferación celular como células Swiss 3T3⁽⁴²⁾ y células tiroideas de perro⁽⁴³⁾.

El AMPc estimula la expresión de los genes que regula a través de una secuencia de 8 pares de bases en el ADN (TGACGTCA), denominada elemento de respuesta al AMPc (CRE), ubicada en el promotor del gen regulado. El gen de *c-fos* presenta una secuencia CRE en su promotor⁽⁴⁴⁾, lo que explica su regulación transcripcional por AMPc.

La estimulación transcripcional por AMPc requiere la activación de la PKA. Esta es una proteína tetramérica, formada por 2 subunidades regulatorias y 2 subunidades catalíticas, que está localizada en el citoplasma, probablemente por interacción de la subunidad regulatoria R_2 con proteínas específicas de anclaje llamadas AKAPs (de cAMP-dependent Kinase Anchoring Protein)⁽⁴⁵⁾. La unión del AMPc a las subunidades regulatorias (se requiere una molécula de AMPc para cada subunidad regulatoria) determina la disociación del complejo tetramérico de la PKA. Las subunidades catalíticas se liberan y pueden actuar en el citoplasma o traslocarse pasivamente al núcleo. Esta traslocación nuclear es lenta -llega al plateau 15 a 20 minutos tras el estímulo del AMPc-, lo que la constituye en el paso limitante de la intensidad de la transcripción dependiente de AMPc⁽⁴⁴⁾.

El sustrato fisiológico de la PKA en el núcleo lo constituye una familia de proteínas, la primera de las cuales fue detectada por su unión de alta afinidad a los sitios CRE del ADN, por lo que recibió el nombre de CREB (de CRE Binding Protein o proteína que se une al CRE). Estas proteínas son factores de transcripción cuya estructura mostró la presencia de un motivo bZIP (región básica + cierre de leucina) en el extremo carboxiterminal de la molécula⁽⁴⁴⁾. Las funciones del dominio bZIP son la dimerización y la unión

al ADN pero, a diferencia de otros factores de transcripción con dominio bZIP, estas proteínas actúan como homodímeros. Son miembros de esta familia: CREB, ATF-1 y CREM (CRE Modulator, o modulador de los CRE). El CREB es el más importante en la activación de la transcripción génica dependiente de AMPc. La subunidad catalítica de la PKA, traslocada al núcleo celular, lo fosforila en un solo residuo aminoacídico (Ser-133), pero esta única fosforilación es crítica para su actividad transcripcional⁽⁴⁴⁾.

Es interesante que el promotor del gen que codifica al CREB contenga varias secuencias CRE, que potencian la actividad del promotor en respuesta al AMPc, por lo que estímulos repetidos, o sostenidos, pueden determinar la acumulación de ARNm de CREB y tener un efecto de amplificación (priming) de la respuesta al estímulo⁽⁴⁴⁾.

La fosforilación del CREB en Ser-133 es un requisito ineludible para poder unir a un coactivador de la transcripción génica, la CBP (CREB Binding Protein o proteína que se une al CREB). Esta unión parece ser indispensable para que la transcripción génica inducida por AMPc tenga lugar⁽⁴⁴⁾.

El DBAMPc, un análogo del AMPc permeable a la membrana plasmática y resistente a la hidrólisis por fosfodiesterasas⁽⁴⁶⁾, presenta un comportamiento diferente a los agonistas H_2 en cuanto a la proliferación, diferenciación celular y regulación de los proto-oncogenes *c-myc*, *c-fos* y *c-jun*. Se observó con este agente una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular con una CE_{50} de $1,16 \times 10^{-4}$ M y se confirmó lo publicado en la literatura, al diferenciarse las células U-937 tras 3 días de exposición a concentraciones entre 4 y 10×10^{-4} M. Así lo demuestran el aumento de expresión de CD14 y CD11b, la adquisición de la capacidad de reducir NBT y la aparición una respuesta quimiotáctica al C5a. También el tratamiento con DBAMPc determinó una disminución de los transcritos de *c-myc* y un aumento de los transcritos de *c-fos*.

No existía una explicación satisfactoria sobre la discordancia entre los efectos del DBAMPc y la ausencia de respuesta a los agonistas H_2 . Una posibilidad consistía en que el efecto diferenciador del DBAMPc no fuera mediado por su acción análoga al AMPc sino, por ejemplo, por un efecto de los residuos butirato presentes en su molécula, o por acción sobre otros blancos celulares. El butirato es capaz de diferenciar la línea celular HL-60^{(47),(48),(49)}. No queda claro si ocurre lo mismo con la línea U-937. Se ha comunicado por un lado que en concentraciones de hasta 5×10^{-4} M, inhibe la proliferación, sin cambios madurativos⁽⁵⁰⁾, y que concentraciones mayores son citotóxicas, y por otro lado, que a concentraciones de 10^{-3} M ejerce un efecto diferenciador⁽⁵¹⁾.

Sin embargo, el incremento de c-fos inducido por el DBAMPc fue bloqueado cuando las células U-937 fueron pretratadas con H7, antagonista de la PKA y la PKC y no fue afectado por la preincubación con BIM, lo que sugiere que este efecto del DBAMPc está mediado por la PKA y es independiente del butirato.

En forma adicional, en la línea celular HL-60, tanto la histamina como el dimaprit y otros agentes que elevan el AMPc inducen la diferenciación celular a través de la activación de la PKA^{(9),(52),(53)}.

Si los efectos del DBAMPc sobre la línea U-937 también están mediados por la PKA, **una explicación alternativa para el fracaso de los agonistas H₂ como agentes diferenciadores, es que su estímulo sea breve, insuficiente para inhibir la proliferación y desencadenar la diferenciación.** El DBAMPc es resistente a la hidrólisis por fosfodiesterasas, por lo que probablemente activa en forma prolongada a la PKA. El estímulo mediado por receptores, en cambio, podría sufrir un feed-back negativo veloz por desensibilización. Además el AMPc sintetizado es rápidamente degradado por las fosfodiesterasas.

Para probar estas hipótesis se desarrollaron los experimentos de proliferación, diferenciación y variación en la expresión de c-myc con forskolina. En forma simultánea, se estudió la cinética de atenuación homóloga y heteróloga del aumento de AMPc inducido por agonistas H₂ y por forskolina.

La forskolina es un diterpeno extraído de las raíces del arbusto hindú *Coleus forskohlii*. Se une y estimula en forma directa a la adenilciclase, con lo que aumenta la síntesis celular de AMPc^{(54),(55)}. Dado su particular mecanismo de acción, esperábamos que produjera un estímulo duradero, con una activación prolongada de la PKA.

Los resultados experimentales confirmaron las suposiciones enunciadas. La forskolina inhibió la proliferación de las células U-937 en forma reproducible y dosis-dependiente. Más importante aún, su potencia como antiproliferativo fue muy similar a su potencia para estimular el aumento de AMPc ($CE_{50} = 22 \times 10^{-6}$ M y $30,7 \times 10^{-6}$ M respectivamente), lo que sugiere que esta inhibición proliferativa está mediada vía AMPc-PKA. Además, la forskolina a altas concentraciones -aproximadamente 3 veces la CE_{50} para estimular la adenilciclase-, indujo la diferenciación de la línea U-937, demostrado por la adquisición de funciones clave de las células fagocitarias, como son el estallido respiratorio tras el estímulo con PMA y la respuesta quimiotáctica al C5a. Finalmente este tratamiento con forskolina produjo, al igual que el DBAMPc, un descenso brusco y veloz en los niveles celulares de la proteína Myc, que se volvió indetectable a partir de las 3 horas de estimulación, lo que confirma su acción diferenciante.

Los agonistas H₂, en cambio, pese a poseer mayor potencia y una eficacia similar o mayor para estimular la adenil ciclase que la forskolina, volvieron a mostrarse inefectivos como agentes diferenciadores.

Por otro lado, los estudios de la cinética de atenuación de la elevación del AMPc por estímulos prolongados con agonistas H₂ mostraron en forma reiterada que los receptores H₂ de la línea celular U-937 sufren una rápida pérdida de su capacidad de respuesta, con un tiempo medio de 20 minutos y una imposibilidad total de aumentar el AMPc tras 120 minutos de estímulo constante. El mecanismo responsable de este fenómeno queda restringido a nivel del propio receptor, o sea que la desensibilización es homóloga, ya que tanto la forskolina como la PGE₂ fueron capaces de inducir aumentos del AMPc luego de una preincubación prolongada de las células con el agonista H₂. Una mayor actividad de fosfodiesterasas como explicación de esta desensibilización queda descartada, ya que resultaría en una disminución de las respuestas a PGE₂ y a forskolina.

La desensibilización es un fenómeno observado en casi todos los receptores acoplados a proteínas-G. Está caracterizado por una atenuación de la respuesta celular al agonista. En contraste con las frecuentes evidencias acerca de la desensibilización del receptor H₁ de histamina, existe relativamente poca información sobre este fenómeno en receptores H₂ y su mecanismo molecular no está dilucidado. La desensibilización homóloga de receptores H₂ fue comunicada en la línea celular de carcinoma gástrico humano HGT-1⁽⁵⁶⁾ y en la línea HL-60⁽⁵⁷⁾. Sin embargo, en algunos experimentos en células HL-60, la respuesta a PGE₂ fue levemente afectada, lo que indica la participación de un componente heterólogo⁽⁵⁸⁾. La desensibilización en la línea HL-60 no pudo ser explicada por una disminución del número de receptores presentes en la membrana plasmática, ni por una activación de las fosfodiesterasas. En leucocitos mononucleares, en cambio, la histamina es responsable de una desensibilización de los receptores H₂ β adrenérgicos y a la PGE₂ que fue explicada por un aumento en la actividad de fosfodiesterasas⁽⁵⁹⁾.

Los mecanismos de desensibilización de receptores acoplados a la adenilato ciclase fueron extensamente caracterizados para los receptores β adrenérgicos (βAR)⁽⁶⁰⁾. La desensibilización rápida y homóloga está asociada a la fosforilación del receptor, catalizada por una kinasa específica llamada kinasa de βAR (βARK), que fosforila específicamente al receptor ocupado por el agonista. Otro factor responsable de la desensibilización de los βAR es la β arrestina. La unión de la β arrestina al receptor fosforilado, por el cual posee mayor afinidad, inhibe

la interacción receptor-proteína G, generando un estado de desacople o desensibilización del receptor⁽⁶⁰⁾.

Además de fosforilar al receptor β adrenérgico, la bARK fosforila otros receptores acoplados a proteína G. Hasta la fecha han sido aislados 6 cDNAs diferentes que codifican para isoenzimas de kinasas de β AR, corrientemente llamados kinasas de receptores acoplados a proteína G (GRKs) y 3 proteínas relacionadas a la β arrestina⁽⁶¹⁾. Probablemente esta familia de GRKs y las proteínas relacionadas a la β arrestina están involucradas en un mecanismo regulatorio general para receptores acoplados a proteína G.

Luego del clonado del receptor de histamina H_2 , se determinaron sitios potenciales de fosforilación en el extremo citoplasmático⁽⁶²⁾⁻⁽⁶⁴⁾. Como la desensibilización en las células U-937 resultó ser homóloga, estos sitios serían posibles blancos de una kinasa específica de receptor. Se ha descrito la presencia de la β ARK en la línea U-937, lo que refuerza esta posibilidad⁽⁶⁵⁾.

Esta desensibilización rápida de receptores H_2 en células U-937, permitiría explicar el aumento transitorio y no sostenido de c-fos, reafirmando la hipótesis que dicho incremento es mediado por AMPc. Por otra parte esta rápida desensibilización, con la consecuente caída de la respuesta de AMPc, impediría la regulación del proto-oncogén c-myc, la inhibición proliferativa y la diferenciación de la línea celular U-937.

Esto es concordante con el hecho de que en células HL-60, donde tanto la histamina como los agonistas H_2 inducen la diferenciación celular dependiente de la vía del AMPc-PKA, la desensibilización del receptor H_2 tiene lugar más tardíamente, con un tiempo medio de aproximadamente 150 minutos⁽⁵⁷⁾.

La elevación del AMPc mediada por forskolina, por el contrario, no se atenuó ni siquiera tras 24 horas de tratamiento. Mientras la adenilciclasa mantuvo intacta su capacidad de responder a la estimulación por forskolina, el receptor H_2 se desensibilizó, pese a no ser estimulado por ligandos, o sea en forma heteróloga, con una ausencia completa de respuesta al estímulo tras 4 hs de incubación con forskolina.

En el β AR, la desensibilización heteróloga está fisiológicamente mediada por la PKA, que fosforila al receptor en 2 sitios, uno en la región N-terminal del extremo C-terminal de la molécula y otro en la región C-terminal del tercer bucle intracitoplasmático, en una zona esencial para el acople de la proteína G_s ⁽⁶⁰⁾. Este segundo sitio es fosforilado preferentemente por la PKA, lo que parece ser suficiente para bloquear la habilidad del receptor para activar la proteína G_s ⁽⁶⁰⁾. La PKA no muestra preferencia por los receptores ocupados con ligandos, lo que explica que esta desensibilización pueda ser heteróloga.

La PKC también puede fosforilar al β AR, probablemente en los mismos sitios que la PKA, con la misma preferencia por el tercer bucle citoplasmático y con idénticas consecuencias⁽⁶⁰⁾.

La desensibilización mediada por PKA ha sido también observada en otros receptores acoplados a proteína G_s , como los receptores para PGE_1 y para dopamina DA_1 ⁽⁶⁰⁾. Probablemente este sea el mecanismo por el cual el tratamiento con forskolina atenúa la respuesta H_2 en la línea U-937.

La respuesta diferenciadora a la elevación del AMPc, o al DBAMPc, que presentan múltiples líneas celulares con capacidad de diferenciación mieloide y monocitaria (HL-60, U-937, PLB-985⁽⁶⁶⁾), sugieren que la expresión de genes activados por AMPc probablemente juegue un rol fisiológico importante en la diferenciación normal de estos linajes celulares. Apoyando esta hipótesis, existen evidencias que indican que los agonistas H_2 podrían participar en el reclutamiento de células formadoras de colonias esplénicas (CFC-S) de médula ósea de ratón en reposo proliferativo, hacia la fase S del ciclo celular^{(6),(7)}.

El hecho que estímulos con vías de transducción de señales tan diferentes como por ejemplo el AMPc, el ATRA, o los ésteres del forbol -por citar sólo algunos ejemplos- induzcan la diferenciación terminal mielomonocítica, y que en muchos casos su efecto sea aditivo o sinérgico^{(14),(31),(32),(33),(67)}, sugiere que al final de estas vías se activan algunos genes comunes.

Una observación repetida en los modelos de diferenciación mielomonocítica con líneas celulares es que la maduración celular se desarrolla al margen de los cambios genéticos involucrados en la transformación, puesto que el cariotipo de las células así diferenciadas permanece anormal⁽⁶⁸⁾. Hay, por lo tanto, múltiples vías de estimulación posibles para inducir la diferenciación de las células leucémicas susceptibles, saltando los defectos genéticos y revirtiendo el fenotipo maligno⁽³¹⁾. En este sentido, la combinación de compuestos buscando un efecto sinérgico, como se observa con las líneas celulares, puede merecer un rol importante⁽³¹⁾.

Se ha sugerido un modelo conceptual, basado en la experiencia clínica con el ATRA en APL y en los estudios con líneas celulares, en que la terapéutica con agentes diferenciadores se emplea en un primer paso para reducir el clon leucémico lo más posible. Los límites de este tratamiento, como se ve en la clínica y en el laboratorio, están dados por el surgimiento de subclones resistentes a los inductores de la diferenciación. Por ello este tratamiento diferenciante debe ser combinado con, o seguido por, tratamiento quimioterápico, en un intento curativo⁽³¹⁾. Las células resistentes a los inductores de la diferenciación pueden aún responder a la poliquimioterapia y la combina-

ción de ambas modalidades disminuiría el desarrollo de células resistentes y la frecuencia de las recidivas leucémicas⁽³¹⁾.

En todo caso, los agentes que median una elevación del AMPc constituyen una herramienta potencial para sumar al arsenal de la terapéutica no citotóxica de las LA. El fracaso de la diferenciación U-937 por desensibilización del receptor H₂ sugiere que los agentes ideales para este tipo de ensayo terapéutico serían el DBAMPc o la forskolina, por lo sostenido de su acción activadora de la PKA.

ABSTRACT

Signal pathway and regulatory effects of histamine H₂ receptors were investigated in human leukemic cells, to explore its therapeutic potential in non cytotoxic treatments.

Binding assays disclosed both types of specific histamine binding sites -H₁ and H₂- in nearly every sample of peripheral blood or bone marrow from acute leukemic patients, unrelated to the blast count. This suggests the H₂ receptor is commonly expressed in normal or transformed hematopoietic cells.

The U-937 cell-line, a monoblastic cell model, has H₂ receptors coupled to cAMP synthesis. No changes in U-937 cells proliferation or differentiation were induced upon stimulating H₂ receptors. However, a transient protein kinase A (PKA)-mediated rise in Fos and Jun expression, without a Myc decrease, were seen.

A *short-lived* PKA activation, triggered by histamine H₂ receptor stimulation, could hypothetically explain the U-937 cell-differentiation failure. Accordingly, H₂ receptors disclosed a *rapid* homologous desensitization (T_{1/2} = 20'). Forskoline-induced cAMP elevation through a direct adenylyl cyclase activation, however, did not desensitize after a 24 hours exposure.

Forskoline also inhibited U-937-cell proliferation at the same dosis stimulating cAMP synthesis and induced a phagocytic differentiation, demonstrated by an increase in NBT reduction and the appearance of a chemotactic response to C5a.

Conclusion: 1) A quick desensitization of a receptor transducing a differentiation signal, like histamine H₂ receptors in U-937 cells, might be a physiopathogenetic mechanism in malignant transformation, through a maturative signalling blockade in the neoplastic cell. 2) Both, the present results and the differentiation properties of dibutyryl cAMP in myeloid cell lines, warrant further studies of cAMP elevating agents in AML treatment.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gale, R.P., Hoffbrand, A.V. Acute leukaemias: biology and treatment. *Clin Haematol*, 15 (3): 567, 1986.
2. Tivey, H. The natural history of untreated acute leukemia. *Ann N Y Acad Sci*, 60: 322, 1955.
3. Tallman, M.S., Andersen, J.W., Schiffer, C.A., et al. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*,

- 337: 1021, 1997.
4. Sawyers, C.L. Molecular genetics of acute leukaemia. *Lancet*, 349: 196, 1997.
5. Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.-G., et al. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med*, 339 (19): 1341, 1998.
6. Schneider, E., Piquet-Pellorce, C., and Dy, M. New role for histamine in interleukin-3-induced proliferation of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*, 143: 337, 1990.
7. Piquet-Pellorce, C., Schneider, E., and Dy, M. GM-CSF in association with IL-1 triggers day-8 CFU-S into cell cycle: role of histamine. *J Cell Physiol*, 149: 18, 1991.
8. Tasaka, K., and Nakaya, M. The relationship between incorporation of histamine and differentiation of neutrophil progenitors in murine bone marrow. *Agents and Actions*, 20: 320, 1987.
9. Nonaka, T., Mio, M., Doi, M., and Tasaka, K. Histamine-induced differentiation of HL-60 cells. The role of cAMP and protein kinase. *A. Biochem Pharmacol*, 44: 1115, 1992.
10. Tasaka, K., Doi, M., Nakaya, N., and Mio, M. Reinforcement effect of histamine on the differentiation of murine myeloblasts and promyelocytes: externalization of granulocyte colony-stimulating factor receptors induced by histamine. *Mol Pharmacol*, 45: 837, 1994.
11. Sundstrom, C.; Nilsson, K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976; 17: 565-77.
12. Harris, P. and Ralph, P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and the U-937 cell lines. *J Leukocyte Biol*, 37: 407, 1985.
13. Nilsson, K., Andersson, L.C., Gahmberg, C.G., Forsbeck, K. Induction of differentiation in vitro of human leukaemia and lymphoma cell lines. In International Symposium on new trends in human immunology and cancer immunotherapy, p. 271. B. Serrou and C. Rosenfeld (Eds.). Doin Editeurs, Paris, 1980.
14. Olsson, IL; Breitman, TR. Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents. *Cancer Res*, 4: 3924, 1982.
15. Olsson, I., Gullberg, U., Ivhed, I. and Nilsson, K. Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer Res*, 43: 5862, 1983.
16. Rigby, WFC; Shen, L; Ball, EJ; et al. Differentiation of a human monocytic cell line by 1,25 dihydroxyvitamin D3 (calcitriol): a morphologic, phenotypic, and functional analysis. *Blood*, 64 (5): 1110, 1984.
17. Gavison, R; Matzner, Y; Fibach, E. Differential induction of monocytic functions by dibutyryl cyclic AMP and retinoic acid in a human monoblast cell line U-937. *Isr J Med Sci*, 24: 697, 1988.
18. Sheth, B., Dransfield, I., Partridge, L.J., et al. Dibutyryl cyclic AMP stimulation of a monocyte-like cell line, U937: a model for monocyte chemotaxis and Fc receptor-related functions. *Immunol*, 63: 483, 1988.
19. Gilman, A.G. A protein binding assay for adenosine 3'-5' cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 67: 305, 1970.
20. Hansen, M.B., Nielsen, S.E., and Kurt, B. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119: 203, 1989.
21. Silverman, L.V., and Weinstein, H.J. Treatment of childhood leukemia. *Curr Opin Oncol*, 9: 26, 1997.
22. Hoelzer, D., Thiel, E., Loffler, T., et al. Prognostic factors in a multicentric study for treatment of acute lymphoblastic

- leukemia in adults. *Blood*, 71: 123, 1988.
23. Fiere, D., Lepage, E., Sebban, C., et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: a multicenter randomized trial testing bone marrow transplantation as postremission therapy. *J Clin Oncol*, 11: 1990, 1993.
 24. Bennett, J.M., Young, M.L., Andersen, J.W., et al. Long-term survival in acute myeloid leukemia. *Cancer*, 8: 2205, 1997.
 25. Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 72: 567, 1988.
 26. Castaigne, S., Chomienne, C., Daniel, M.T., et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood*, 76: 1704, 1990.
 27. Warrell Jr., R.P., Frankel, S.R., Miller Jr., W.H., et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N Engl J Med*, 324: 1385, 1991.
 28. Guidez, F., Ivins, S., Zhu, J., et al. Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RAR α underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 91 (8): 2634, 1998.
 29. Miyauchi, J., Kelleher, C.A., Wong, G.G., et al. The effects of combinations of the recombinant growth factors GM-CSF, G-CSF, IL-3, and CSF-1 on leukemic blast cells in suspension culture. *Leukemia*, 2 (6): 382, 1988.
 30. Janssen, J.W.G., Lyone, J., Steenvoorden, A.C.M., et al. Concurrent mutations in two different ras genes in acute myelocytic leukemias. *Nucl Acid Res*, 15: 5667, 1987.
 31. Olsson, I., Bergh, G., Ehinger, M., and Gullberg, U. Cell differentiation in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*, 57: 1, 1996.
 32. Testa, U; Masciulli, R; Tritarelli, E; et al. Transferring growth factor- β potentiates vitamin D $_3$ -induced terminal monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *J Immunol*, 150 (6): 2418, 1993.
 33. Rubin, JE; Chenoweth, DE; Catherwood, BD. 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ and adenosine 3',5'-monophosphate synergistically promote differentiation of a monocytic cell line. *Endocrinology*, 118 (6): 2540, 1986.
 34. Gespach, C., Saal, F., Cost, H., and Abita, J. Identification and characterization of surface receptors for histamine in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. Comparison with human peripheral neutrophils. *Mol Pharmacol*, 22: 547, 1982.
 35. Gespach, C., Cost, H., and Abita, J. Histamine H_2 receptor activity during the differentiation of the human monocytic-like cell line U-937. *FEBS Lett*, 184: 207, 1985.
 36. Gespach, C., Chedeville, A., Hurbain-Kosmath, I., Housset, B., and Abita, J. Adenylate cyclase activation by VIP-helodermin and histamine H_2 receptors in human THP-1 monocytes/macrophages. *Regul Pept* 26: 158, 1989.
 37. Gespach, C. and Abita, J. Human polymorphonuclear neutrophils. Pharmacological characterization of histamine receptors mediating the elevation of cyclic AMP. *Mol Pharmacol*, 21: 78, 1982.
 38. Maurer, W.M., Litos, M., and Lutz, D. Distinct histamine-induced cyclic AMP synthesis in acute leukemia. *Scan J Haematol*, 37 (5): 438, 1986.
 39. Lübbert, M., and Koeffler, M.P. Myeloid cell lines: tools for studying differentiation of normal and abnormal hematopoietic cells. *Blood Rev*, 2: 121, 1988.
 40. Kotecha, S., Wilson, L., Sutcliffe, S., et al. Pharmacological modulation of c-fos mRNA expression in the HL-60 and U-937 cell lines. *Pulm Pharmacol*, 6: 269, 1993.
 41. Bravo, R., Neubergh, M., Burckhardt, J., et al. Involvement of common and cell type-specific pathways in c-fos gene control: stable induction of cAMP in macrophages. *Cell*, 48: 251, 1987.
 42. Mehmet, H., Sinnett-Smith, J., Moore, J.P., et al. Differential induction of c-fos and c-myc by cyclic AMP in Swiss 3T3 cells: significance for the mitogenic response. *Oncogene Res*, 3: 281, 1988.
 43. Baptist, M., Dumont, J., and Roger, P. Intracellular heterogeneity of early mitogenic events: cAMP generalizes the EGF effect on c-Fos protein appearance but not on MAP kinase phosphorylation and nuclear translocation in dog thyroid epithelial cells. *Exp Cell Res*, 221: 160, 1995.
 44. Montminy, M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Ann Rev Biochem*, 66: 807, 1997.
 45. Goldman, P.S., Tran, V.K., and Goodman, R.H. The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Rec Progr Horm Res*, 52: 103, 1997.
 46. Posternak, T.H., Sutherland, E.W., and Henion, W.F. Derivatives of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *Biochim Biophys Acta*, 65: 558, 1962.
 47. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., and Gallo, R.C. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75: 2458, 1978.
 48. Fischkoff, S.A., and Condon, M.E. Switch in differentiative response to maturation inducers of human promyelocytic leukemia cells by prior exposure to alkaline conditions. *Cancer Res*, 45: 2065, 1985.
 49. Hutt-Taylor, S.R., Harnish, D., Richardson, M., et al. Sodium butyrate and a T lymphocyte cell line-derived differentiation factor induce basophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Blood*, 71: 209, 1988.
 50. Laskin, D.L., Beavis, A.J., Sirak, A.A., et al. Differentiation of U-937 histiocytic lymphoma cells towards mature neutrophilic granulocytes by dibutyryl cyclic adenosine-3',5'-monophosphate. *Cancer Res*, 50: 20, 1990.
 51. Rius, C., Zorrilla, A., Mata, F., and Aller, P. Comparative effects of butyrate and N6,2'-O-dibutyryladenine 3':5'-cyclic monophosphate on growth, differentiation and gene expression in U937 human monoblastoid cells. *Biochem Int*, 23: 555, 1991.
 52. Kaliniyakh, K.A., Sawutz, D.G., Lampkin, B.C., et al. Effects of dimaprit on growth and differentiation of human promyelocytic cell line, HL-60. *Life Sci*, 36 (20): 1909, 1985.
 53. Chaplinski, T.J., and Niedel, J.E. Cyclic nucleotide-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells. *J Clin Invest*, 70: 953, 1982.
 54. Seamon, K.B., Padgett, W., and Daly, J.W. Forskoline: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78 (6): 3363, 1981.
 55. Daly, J.W. Forskolin, adenylate cyclase and cell physiology: an overview. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*, 17: 81, 1984.
 56. Prost, A., Emami, S., and Gespach, C. Desensitization by histamine of H_2 receptor-mediated adenylate cyclase activation in the human gastric cancer cell line HGT-1. *FEBS Lett*, 177 (2): 227, 1984.
 57. Sawutz, D.G., Kaliniyakh, K., Whitsett, J.A., and Johnson, C.L. Histamine H_2 receptor desensitization in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 231 (1): 1, 1984.
 58. Johnson, C.L., and Sawutz, D.G. Desensitization of histamine H_2 receptors in human leukemia cells. In: C.R. Ganellin and J.C. Schwartz (eds.), *Frontiers in Histamine Research*, p. 79.

- Pergamon Press, Oxford, 1984.
59. Holden, C.A., Chan, S.C., Norris, S., and Hanifin, J.M. Histamine induced elevation of cyclic AMP phosphodiesterase activity in human monocytes. *Agents and Actions*, 22: 36, 1987.
 60. Lohse, M.J. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta*, 1179: 171, 1993.
 61. Leurs, R., Smit, M.J., and Timmerman, H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmac Ther*, 66: 413, 1995.
 62. Gantz, I., Schaffer, M., Del Valle, J., Logdson, G., Campbell, V., Uhler, M., and Yamada, T. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H₂ receptor. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 88: 429, 1991.
 63. Ruat, M., Traiffort, E., Arrang, J.M., Leurs, R., and Schwartz, J.C. Cloning and tissue expression of a rat histamine H₂-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 179: 1470, 1991.
 64. Gantz, I., Munzert, G., Tashiro, T., Scaffer, M., Wang, L., Del Valle, J., and Yamada, T. Molecular cloning of the human histamine H₂ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 178: 1386, 1991.
 65. Chuang, T.T., Sallese, M., Ambrosini, G., et al. High expression of beta-adrenergic receptor kinase in human peripheral blood leukocytes. Isoproterenol and platelet activating factor can induce kinase translocation. *J Biol Chem*, 267: 6886, 1992.
 66. Tucker, K., Lilly, M.B., Heck, L., and Rado, T.A. Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood*, 70 (2): 372, 1987.
 67. Ways, D.K., Dodd, R.C., Bennett, T.E., et al. Effect of retinoic acid on phorbol ester-stimulated differentiation and protein kinase C-dependent phosphorylation in the U-937 human monoblastoid cell. *Cancer Res*, 48: 5779, 1988.
 68. Sachs, L. The adventures of a biologist: prenatal diagnosis, hematopoiesis, leukemia, carcinogenesis, and tumor suppression. *Adv Cancer Res*, 66:1, 1995.