

EFFECTOS DEL G-CSF α SOBRE CELULAS MADRE
HEMATOPOYETICAS CD34+

LUZ ANGELA GOMEZ GRILLO

LUZ MABEL AVILA PORTILLO
(Director)

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

BACTERIOLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGIA
Bogotá, D. C., Colombia
Noviembre de 2009

RESUMEN

A través de una reseña de algunos de los trabajos realizados desde 1986, año en que se desarrolló el fármaco, hasta el año 2009, hemos tratado de recopilar la información conducente a esclarecer el mecanismo por medio del cual el G-CSF α moviliza las Células Madre Hematopoyéticas CD34+, ya que su utilización adquiere cada día más importancia en el tratamiento de cáncer, enfermedades autoinmunes y pacientes que requiere de un trasplante de Células Madre.

TABLA DE CONTENIDO	Página
1. El Nicho Hematopoyético.....	5
2. Células Madre Hematopoyéticas (HSCs).....	6
2.1 Caracterización de las HSCs.	7
3. Filgrastim.....	10
3.1 Dosis y Administración....	13
3.2 Efectos del tratamiento.....	13
3.3 . Receptor del G-CSF (G-CSFR)	15
4. Movilización de HSCs por efecto del G-CSFrh.....	17
4.1 Movilización de HSCs por efecto de las enzimas producidas por lo neutrófilos.....	18
4.2 Movilización de HSCs CD34+ por efecto de Quimiocinas	19
4.3 Movilización de HSCs por efecto directo del G-CSF sobre su receptor (G-CSFR) en las HSCs CD34+	21
4.4 Movilización por activación de la vía JAK/STAT y otras teorías.....	23
Conclusiones.....	25
Bibliografía.....	27
Anexos.....	21

INTRODUCCIÓN

El factor estimulador de colonias de granulocitos metionil recombinante humano farmacológico (r-metHuG-CSF Filgrastim) es un medicamento producido a partir de tecnología de ADN recombinante. Se ha demostrado tanto en ensayos *in vitro* como en humanos, que el Filgrastim actúa sobre la línea mieloide produciendo su diferenciación a neutrófilos y la movilización de Células Madre Hematopoyéticas (HSCs) CD34+ desde la medula ósea hacia la sangre periférica.

Aún no está definido en la literatura un mecanismo que explique satisfactoriamente el mecanismo de movilización de las Células Madre Hematopoyéticas pero existe un amplio repertorio de teorías que tratan de explicar este fenómeno. Se le atribuye a quimiocinas producidas por las células del estroma de la médula, también al clivaje (por parte de enzimas producidas por los neutrófilos) de las moléculas que mantienen adheridas las células al estroma y se han realizado también estudios para ver si hay regulación de proteínas y genes al interior de la célula una vez se une el G-CSF con su receptor.

Este trabajo pretende mostrar evidencia con respecto a las diferentes dinámicas que se cree gobiernan la movilización de Células Madre y que justifican su utilización a nivel clínico para pacientes con neutropenia post-quimioterapia, para la movilización de células en pacientes candidatos a trasplante y para disminuir el tiempo de hospitalización y morbi- mortalidad debido a infecciones.

1. EL NICHOS HEMATOPOYETICO

Para hablar de las Células Madre, es necesario contextualizar el término delimitando el lugar donde se encuentran, ya que este les proporciona no sólo un ambiente donde permanecer y las condiciones para su subsistencia sino que también desarrolla con las células una comunicación directa a través de sustancias químicas que determinarán el destino de las células madre.

El nicho hematopoyético, un término acuñado por primera vez por Schofield a finales de los 70 (1), comprende el microambiente que está al interior de la Médula Ósea (BM). Esta a su vez es el tejido graso y suave que yace al interior de los huesos y soporta física y fisiológicamente al nicho hematopoyético (2).

El microambiente o nicho hematopoyético está dividido en tres partes: i) Zona osteoblástica localizada cerca del hueso ii) Zona medular, donde están las Células Madre Hematopoyéticas (HSCs) quiescentes y proliferantes; las primeras en un estado latente pero con el potencial de desarrollarse (autorrenovarse, diferenciarse o movilizarse) y las segundas en permanente división iii) Zona perivascular (cercana a los vasos sanguíneos) donde ocurre la salida de las células maduras a circulación (3,4).

Las células que conforman el microambiente hematopoyético pueden estar en diferentes estadios de diferenciación como es el caso de células endoteliales, fibroblastos, adipocitos y osteoblastos y provenir de diferentes orígenes, por ejemplo, Células Madre Mesenquimales y células de origen mesenquimal, o ser de origen hematopoyético no-mesenquimal como macrófagos y células dendríticas (5,6).

La función del nicho es regular la proliferación, autorrenovación y movilización de las Células Madre Hematopoyéticas (HSCs) lo cual realiza a través de mecanismos complementarios tales como producción de moléculas de señalización, modulación de la rigidez de la matriz, creación de gradientes de citoquinas, y regulación del medio fisicoquímico, incluyendo el pH y la tensión de oxígeno (6).

2. CELULAS MADRE HEMATOPOYETICAS CD34+

Las Células Madre son células con capacidad de *autorrenovación*, es decir de dar origen a células igual de indiferenciadas ,así como de *diferenciación* que consiste en dar origen a células progenitoras comprometidas con un linaje específico. Según su capacidad de diferenciación, las células madre pueden ser clasificadas en dos grupos; las células Pluripotentes ó Células Madre Embrionarias (ESCs), que dan origen a las tres capas del embrión: ectodermo, mesodermo y endodermo, de las cuales se originan todas las células del organismo; y un segundo grupo denominadas Células Madre Multipotentes. Estas se encuentran en los diferentes tejidos fetales y pueden dar origen a grupos variados pero limitados de células. El grupo de células multipotentes incluye las células madre neuronales, hepáticas y hematopoyéticas, entre otras (7). La capacidad de diferenciación de estas células multipotentes se ve claramente reflejada en las HSCs que son capaces de reconstituir todas las líneas celulares hematopoyéticas del cuerpo, bien sea a lo largo de la vida o después de un proceso mieloablatoivo (8).

La existencia y función de las HSCs se pudo establecer por la aparición de células hematopoyéticas adultas en ratones irradiados, después de ser inyectados con Células Madre de Médula Ósea (BM) (9). Es pertinente aclarar que el proceso al que fueron sometidos los ratones tiene como consecuencia la muerte tanto de las células hematopoyéticas adultas como de cualquier progenitor o célula madre, es decir que la única explicación para la aparición de estas células adultas era la regeneración del tejido hematopoyético del ratón por parte de las Células Madre de la BM inyectadas.

Las HSCs pueden migrar de Sangre Periférica (PB) a BM (anidamiento) y de BM a PB (movilización). Esta segunda, la movilización, está siendo inducida con fármacos o citoquinas y utilizada hoy en día para realizar transplantes de HSCs en pacientes con cáncer, inmunodeficiencias, enfermedades hematopoyéticas y no hematopoyéticas (diabetes autoinmune) entre otras (7).

Las HSCs poseen otra facultad denominada *plasticidad* y consiste en que la HSC es capaz de dar origen a células diferentes a las del linaje hematopoyético, por ejemplo células neuronales (10,11), de músculo esquelético (12), músculo cardiaco (13,14), y células hepáticas (15) como también epitelio de la piel, pulmones y riñones, esto gracias a la señalización del medio en el que se encuentre (16). Esta característica, cabe resaltar, no es exclusiva de las HSCs, es una característica de las Células Madre (SCs) en general y para observarla hay que poner células madre en un nicho diferente al que le es propio.

Las HSCs provienen básicamente de tres fuentes. Como ya se había mencionado se encuentran en BM y la forma de obtenerlas es realizando una punción en la cresta ilíaca del paciente. Están también en Sangre de Cordón Umbilical (UCB) (17) y en PB en pequeñas cantidades, pero pueden aumentar sustancialmente si el paciente es tratado con un agente movilizador como sustancias citotóxicos ó citoquinas (18).

2.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS HSCs

Desde el desarrollo de anticuerpos anti-sialomucina (anti-CD34) hace más de dos décadas (19), este antígeno ó molécula de superficie de las células se ha convertido en el marcador por excelencia para las HSCs y células progenitoras. Aunque su papel no ha sido totalmente esclarecido, su expresión en las HSCs sugiere funciones de adhesión al estroma de la médula (20). Cabe anotar que el CD34+ no es el único marcador utilizado para identificarlas, la HSCs exhiben en su superficie otros marcadores que son de gran utilidad para clasificarlas, tal es el caso de CD44, CD11a, CD18, CD62L, CD31 y CD49d.

Considerando entonces que existen tres fuentes de HSCs, las variaciones que pudieran existir entre estas, aunque sutiles, han sido también objeto de estudio. Se ha encontrado que las HSCs de UCB exhiben menor expresión de CD49e, CD49f, CXCR4 y CD54 que las células de las otras dos fuentes y ninguna de las anteriores exhiben

receptores para otras quimiocinas como CCR-1, CCR-2, CCR-3, CCR-5, CXCR1, CXCR2, CXCR3 ó CXCR5 (21).

En estudios cuyo objeto era investigar la expresión de receptores de quimiocinas en las CD34+, los niveles de expresión de CXCR4 de células de UCB fresca y criopreservada, y de BM y PB criopreservada fueron de (49.52 +/- 1.12)%, (46.12 +/- 2.29)%, (48.50 +/- 2.48)% (65.39 +/- 1.27)%, respectivamente (22). No está de más mencionar que la razón para que se estudien en estas células los receptores CXCR y en especial el CXCR4, aunque se discutirá más a fondo adelante, radica en que este receptor podría (o no?) ser determinante, o al menos colaborar en cierta medida con el proceso de movilización inducida de las HSCs.

Un hallazgo que llamó la atención de los investigadores en un estudio de comparación de los tres tipos de HSCs fue la expresión por parte de las células de UCB de las dos metaloproteinasas de matriz MMP-2 [(11.4 +/- 4.9)%] y MMP-9 [(27.6 +/- 7.8)%] (21). Estas dos proteasas cobrarán también importancia a medida que se desarrolle el tema de la movilización inducida por las proteasa producidas por neutrófilos.

El agente movilizador más utilizado es el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos recombinante humano (G-CSFrh o Filgrastim). La síntesis y utilización del G-CSFrh tienen como origen la observación de la acción de este factor de crecimiento *in vitro* ya que este es sintetizado, aunque en pequeñas cantidades, por células formadoras de hueso u osteoblastos, monocitos, macrófagos, (32), células vasculares endoteliales, fibroblastos, células mesoteliales y células del estroma de la médula (29). Dado que existen varias células que producen el factor, este circula en sangre aunque en muy pequeñas cantidades, en suero en humanos puede ser detectado en un rango de <30-163 pg/mL (32).

La razón para que el G-CSFrh sea el medicamento de elección para movilizar a los pacientes se basa en que el tratamiento con este fármaco, comparado con otros

agentes movilizadores, tiene como resultado un número suficiente de HSCs para trasplantes con un mínimo de toxicidad (32). También se ha observado con su uso una recuperación más rápida de plaquetas y neutrófilos, necesidad de menos transfusiones de plaquetas, reconstitución linfocitaria más rápida y menos periodos de neutropenia febril (23).

3. FILGRASTIM

La purificación y clonación molecular del Filgrastim (G-CSFrh) se realizaron entre 1984 y 1986 (24,25, 26). Fue purificado por primera vez de medio condicionado de placenta por Nicola y Metcalf en el año 86 (30), y hoy en día se produce con tecnología de DNA recombinante en la bacteria *Escherichia coli*.

Aunque la historia de este medicamento data de los años 80, la aprobación para su uso clínico en pacientes en tratamiento de quimioterapia (uno de sus usos más frecuentes) sólo se obtuvo en los Estados Unidos hasta Febrero de 1991 (27, 28).

Hoy en día, además de la neutropenia inducida por quimioterapia, el Filgrastim ha sido aprobado en más de 70 países para tratamiento de mielosupresión pos-transplante (ablación del sistema hematopoyético por completo para evitar el rechazo del transplante), Neutropenia Crónica Severa (SCN) , Leucemia Aguda (AL), Anemia Aplásica (AA), Síndromes Mielodisplásicos (MDS) y movilización de células madre para trasplantes (31).

El G-CSFrh ó Filgrastim es una glicoproteína de 174 aminoácidos, con un peso molecular de 18-22 kD (Figura 1). Su estructura está formada por hélices antiparalelas, presentando además dos puentes disulfuro entre las cisteínas C39-C45 y C67-C77 y una glicosilación en la treonina 133 que contribuye a su estabilidad.

El G-CSFrh es muy similar al G-CSF endógeno pero no idéntico, se le adicionó una metionina en el extremo amino-terminal necesaria para su expresión en *E.coli* y este es glicosilado (30).

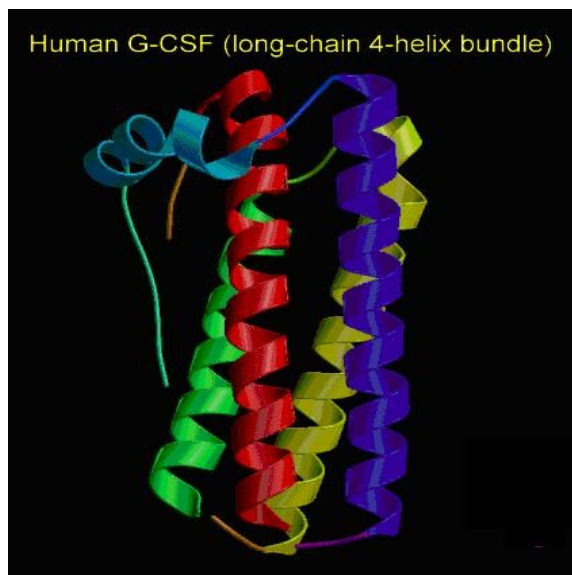


FIGURA 1 ESTRUCTURA DEL G-CSF

Tomado de:

http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytweb/cyt_structs/index.html

Los laboratorios Amgen Inc. fueron los primeros en desarrollar un G-CSFrh comercial llamado NEUPOGEN®, y les fue otorgada la patente N° 4,810,643 el 7 de Marzo de 1989. Al liberar la patente, en Marzo 7 de 2006 salieron a la venta otras versiones del filgrastim tales como Leucosos de Chalver, PEGfilgrastim de Amgen Inc, Biofigran de Procaps y TevaGrastim de Teva Pharmaceutical Industries Ltd entre otros. Sin embargo, el NEUPOGEN® sigue siendo el medicamento de referencia y sobre el cual se desarrollaron, en los laboratorios Amgen Inc, todos los estudios pertinentes. Es por esto que a continuación se describirá el G-CSFrh en virtud de la información disponible acerca del NEUPOGEN®.

El medicamento original (NEUPOGEN®) tiene diferentes presentaciones farmacéuticas: viales ó jeringas (Tabla 1). Es un líquido incoloro, libre de preservativos, que debe ser

administrado por vía intravenosa o subcutánea y que contiene Filgrastim a una actividad específica de $1.0 \pm 0.6 \times 10^8$ U/mg (medido por ensayos de mitogénesis celular) (32).

La siguiente tabla muestra la composición del producto dependiendo de la presentación:

	Vial 300mcg/ 1.0 mL	Vial 480mcg/ 1.6 mL	Jeringa 300mcg/ 0.5 mL	Jeringa 480mcg/ 0.8 mL
Filgrastim	300 mcg	480 mcg	300 mcg	480 mcg
Acetato	0.59 mg	0.94 mg	0.295 mg	0.472 mg
Sorbitol	50.0 mg	80.0 mg	25.0 mg	40.0 mg
Polysorbato 80	0.04 mg	0.064 mg	0.02 mg	0.032 mg
Sodio	0.035 mg	0.056 mg	0.0175 mg	0.028 mg
Agua	1.0 mL	1.6 MI	0.5 mL	0.8 mL

Tabla 1: Descripción de la composición de cada una de las presentaciones de Neupogen.

Tomado de :<http://www.neupogen.com/pi.html>

La absorción y eliminación del NEUPOGEN[®] sigue un modelo de farmacocinética de primer orden, es decir que la tasa de eliminación depende de la concentración del fármaco en sangre.

La vida media de eliminación en individuos normales y pacientes con cáncer fue de aproximadamente 3.5 horas. La tasa de eliminación fue de 0.5 a 0.7 mL/minuto/kg. La administración continua por vía intravenosa de 20 mcg/kg por un periodo de 11 a 20 días produjo una concentración estable en suero sin evidencia de acumulación del producto durante el tiempo que duró el estudio (32).

3.1 DOSIS Y ADMINISTRACION

El esquema de administración del medicamento varía dependiendo de la enfermedad que se esté tratando, y el rango de dosis que se maneja es de 4 - 69 mcg/kg/día por vía intravenosa ó subcutánea, siendo las dosis de la aplicación subcutánea menores. No debe ser administrado ni 24 horas antes ni después de la quimioterapia. El NEUPOGEN[®] está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad conocida a proteínas de E coli, ó cualquier componente del producto (32).

3.2 EFECTOS DEL TRATAMIENTO

El tratamiento con NEUPOGEN[®] reduce significativamente el tiempo de recuperación de pacientes tratados para diferentes enfermedades reduciendo la duración de la fiebre, el uso de antibióticos, y el tiempo de hospitalización. Ratones que no podían producir el G-CSF endógeno tuvieron neutropenia crónica y movilización defectuosa de neutrófilos, lo que indica que el G-CSF es indispensable para mantener la producción de neutrófilos en un estado basal, y sugiere también que el G-CSF tiene un papel importante en la granulopoyesis de emergencia en respuesta a una infección (33).

El efecto del G-CSF sobre los neutrófilos es vital en ciertas enfermedades ya que la principal función de los neutrófilos es mantener la inmunidad antibacterial. Estos fagocitos ingieren a los patógenos y liberan sustancias citotóxicas, quimioattractantes e inflamatorias en el sitio de la lesión, que amplifican la respuesta del huésped y favorecen la inmunidad adaptativa atrayendo células dendríticas y macrófagos (34).

Entre los efectos del G-CSF^{rh} sobre los neutrófilos están la estimulación de proliferación de precursores mieloides y la reducción del tiempo de tránsito de los neutrófilos inmaduros por médula para ser liberados más rápidamente a circulación. También moviliza vesículas secretoras e induce a liberación del contenido de los gránulos, activando la función fagocítica y el estallido respiratorio (35). Se conoce actualmente que el efecto clínico del Filgrastim es mucho más amplio del aprobado

inicialmente para su utilización en neutropenias, prueba de esto es que el receptor del G-CSF (G-CSFR) se ha encontrado en una gran variedad de células humanas lo que demuestra la diversidad de tejidos sobre los que puede actuar. Entre las células que lo expresan no sólo se encuentran las células hematopoyéticas incluyendo neutrófilos maduros, progenitores mieloides, sino la célula madre hematopoyética, monocitos y linfocitos, como también células no hematopoyéticas tales como cardiomiocitos, precursores neuronales, células endoteliales y de placenta (36).

3.3 RECEPTOR DEL G-CSF CD114 (G-CSFR)

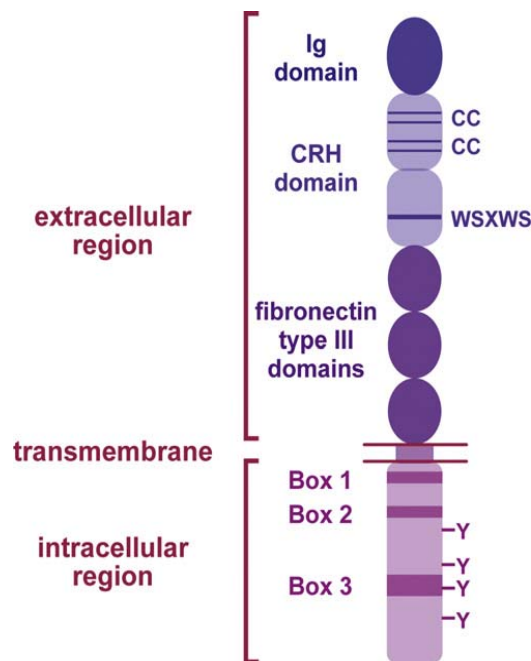


FIGURA 2 ESTRUCTURA DEL G-CSFR El factor consta de tres dominios, uno intracelular, uno transmembranal y uno extracelular, cada uno consta de componentes con funciones específicas.

Tomado de: Granulocyte colony-stimulating factor receptor: Stimulating granulopoiesis and much more. Clifford Lionguea,c, Craig Wrightb, Aaron P. Russellb, Alister C. Warda. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2009), doi:10.1016/j.biocel.2009.08.011

El G-CSFR es un miembro de la superfamilia de receptores de citoquinas de clase 1 (37). En una proteína transmembranal con una gran región extracelular que incluye un dominio tipo inmunoglobulina, uno llamado Homólogo de Receptor de Citoquinas (CRH), y tres dominios tipo fibronectina III. El dominio CRH posee un residuo de cisteína y un motivo de 5 aminoácidos (W-S-X-W-S) (Fig 2). La región intracelular carece de actividad intrínseca de tirosina-quinasa, pero contiene dos motivos conservados proximales a la membrana; Box 1 y Box 2 involucrados en la activación de Jak quinasa y uno más distal, Box 3,

importante para la transducción de señales (37).

Se ha demostrado que el receptor purificado se une a G-CSF con dos afinidades. La primera representa una actividad de unión de alta afinidad ($k_d=120$ a 360 pmol/L) que parece representar la forma oligomérica del receptor de G-CSF, mientras que la segunda es una afinidad moderada ($k_d= 2.6$ a 4.2 nmon/L) que se da con la estructura monomérica de la proteína solubilizada del receptor (38).

La unión con el ligando lleva a la multimerización del receptor y la activación de múltiples cascadas de señalización intracelular incluyendo las vías, Ras/Raf/Erk y PI 3-kinase/Akt, que son los que conducen a los cambios transcripcionales que tienen como consecuencia cambios en la supervivencia, migración, proliferación, y diferenciación de las células. La señales terminan por una combinación de reguladores negativos, la internalización y ubiquitinización del receptor (36).

4. MOVILIZACION DE HSCs POR ACCION DEL G-CSF

Entender el efecto clínico de la movilización de las HSCs desde BM a PB pos tratamiento con el G CSFrh, es aún motivo de investigación. Se han postulado diferentes teorías que explican el fenómeno, que no son mutuamente excluyentes y son resultado de diferentes estudios. A lo largo de esta monografía se discutirán algunas evidencias que soportan estas hipótesis : (i) La producción de enzimas por parte de los neutrófilos (Elastasa de Neutrófilos (NE), Catepsina G (CG), Metaloproteinasa-9 (MMP-9) y Metaloproteinasa-2 (MMP-2) que rompen la unión de las HSCs con las moléculas de adhesión (VLA-4/ VCAM-1 ó CD106) que las mantienen unidas al nicho; (ii) La producción de señales químicas (CXCL12 ó SDF-1 y su receptor CXCR4); (iii) La unión específica del G-CSF con su receptor (G-CSFR) y los efectos que esto tienen al interior de la célula, tanto físicos como a nivel de transcripción de genes y proteínas y todas las vías de señalización interna involucradas en estos procesos (39).

La interacción entre el microambiente y las HSCs en médula ósea es esencial para los procesos de anidamiento, proliferación y diferenciación de las células de la sangre. Las interacciones moleculares ocurren por reconocimiento mutuo de ligandos y receptores localizados en la superficie tanto de las células estromales como de las HSC. La movilización de las HSC puede ser causada por un conjunto de eventos interrelacionados mediados por varios tipos de células y por factores solubles que se difunden en el nicho hematopoyético (40).

Lograr en pacientes una movilización exitosa con G-CSF, es decir, alcanzar el número deseado de HSCs, puede depender de diversos factores como la edad, la patología, el grado de compromiso, la carga de quimioterapia y/o radioterapia recibida, además de la intensidad del tratamiento. Por otra parte, también depende de las características del producto utilizado (31).

4.1 MOVILIZACION DE HSCs POR EFECTO DE LAS ENZIMAS PRODUCIDAS POR LOS NEUTROFILOS

La administración de G-CSF a pacientes resulta en una serie de eventos que comienzan con el aumento del número de neutrófilos en la BM, donde se encuentran alojadas las HSCs. Los neutrófilos secretan proteasas que rompen la unión de las HSCs con sus moléculas de adhesión en la BM (41).

Al parecer este proceso requiere, por una parte, de la penetración de las HSCs en la lámina basal subendotelial y por el otro, la producción de enzimas que degraden la matriz. El G-CSF induce de síntesis de enzimas proteolíticas que son secretadas por los neutrófilos tales como NE (Elastasa de Neutrófilos), CG (Catepsina G), MMP-9 (Metaloproteinasa-9) y MMP-2 (Metaloproteinasa-2). Las metaloproteinasas, son unas enzimas producidas por los neutrófilos componen una familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc y calcio cuya función es la de degradar los componentes de la matriz extracelular (ECM) (42). La molécula Antígeno Tardío-4 (VLA-4 ó $\alpha_4\alpha_1$ Integrina) se expresa en la mayoría de las HSCs. Aunque VLA-4 se puede unir a varios ligandos presentes en el microambiente de la BM, su interacción con la Molécula de Adhesión Vascular (VCAM-1) se ha identificado como una unión clave en la modulación de la movilización. VCAM-1 se expresa de forma constitutiva en las células endoteliales y estromales de la BM (43). La movilización de las HSCs está influenciada por la disrupción ocasionada por las enzimas proteolíticas de la unión entre VLA-4 presente en el estroma y VCAM-1 presente en la célula (44). Esto se demostró al observar que la inhibición de la unión de VLA-4 con VCAM-1 a través del uso de anticuerpos monoclonales anti- VLA-4 ó anti-VCAM-1 tiene como resultado la rápida movilización de HSCs a sangre periférica (45).

En un experimento con ratones movilizados con G-CSF se observó un incremento en la concentración de NE, CG en los fluidos extracelulares de la BM, y además los mayores niveles de concentración de estas enzimas estaban directamente relacionados con la disminución de la expresión de VCAM-1 en HSCs y con la movilización de estas a

sangre periférica (46). Sin embargo tres estudios importantes han mostrado que ratones deficientes en la producción de MMP-9 poseen un incremento en el número de HSCs en sangre periférica similar al de los ratones de genotipo silvestre después de ser tratados con G-CSF (47, 48). En otro estudio también realizado en ratones, se reportó que la movilización con G-CSF no cambiaba significativamente en ratones deficientes de las proteasas NE y CG con respecto a los de genotipo silvestre y tampoco los niveles de VLA-4 en ambos tipos de ratones (48). Resultados similares fueron obtenidos en ratones deficientes de la enzima dipeptil peptidasa I, requerida para la activación funcional de las proteasas serina de neutrófilos y en ratones en los que fue inhibida la expresión de proteasas serina y metaloproteinasas, donde las HSCs se movilizaron por igual (49).

Aunque hay evidencia sólida que permite concluir que la movilización de HSCs está mediada por la acción de proteasas sobre las moléculas de adhesión, los experimentos realizados con ratones descritos anteriormente necesariamente llevan a concluir que debe haber otros mecanismos involucrados mediante los cuales actúa el G-CSF. A continuación, se explicarán a fondo algunos de estos mecanismos.

4.2 MOVILIZACIÓN POR QUIMIOCINAS

Las HSCs CD34+ tanto murinas como humanas expresan una proteína que funciona como receptor de quimiocinas llamado CXCR4 (50). El Factor Derivado del Estroma 1 (SDF-1), es otra quimiocina, pero esta se expresa de forma constitutiva por las células estromales de la BM incluyendo los osteoblastos y es un potente quimioattractante para HSCs que regula la adhesión, supervivencia y ciclo celular de estas. El SDF-1 (en células CD34+) y su receptor (en células del estroma), el CXCR4, interactúan para regular la migración de células de BM (50). Esta teoría sugiere que el G-CSF es capaz de reducir la síntesis de SDF-1 en BM disminuyendo la adhesión de las HSCs a esta. Entre los hallazgos recientes que sustentan esta teoría está un estudio que revela que

anticuerpos neutralizantes anti-CXCR4 ó anti-SDF-1 reducen significativamente el anidamiento y aumentan la movilización de las HSCs (51). También se comprobó a través de un ensayo, que quimeras CXCR4^{-/-} (Células que no expresan CXCR4) de BM muestran movilización constitutiva (52) y que el tratamiento con antagonistas de CXCR4 resulta en la rápida movilización de HSCs (53, 54).

Los mecanismos que regulan la expresión de SDF-1 son un tanto controversiales. Reportes previos sugerían que las enzimas de los neutrófilos podían regular la expresión de SDF-1 a través del clivaje de las moléculas, como era el caso de VLA-4 y VCAM-1 (51, 41), pero ratones deficientes de las enzimas NE y CG exhibían una movilización normal y los niveles de SDF-1 disminuían de la forma esperada, lo que llevó a concluir que este mecanismo no requería de la presencia de enzimas (48).

Estudios realizados en ratones deficientes de SDF-1 o CXCR4 han determinado que la expresión de estos genes es necesaria para la migración normal de HSCs del hígado fetal a la BM y en la retención eficiente de precursores mieloides en la BM adulta (55), lo que podría atribuirle un papel en el desarrollo fetal de las HSCs y un papel relacionado con los precursores mieloides pero no necesariamente le da peso a la importancia del complejo SDF-1/CXCR4 en la movilización.

Como se mencionó anteriormente, el SDF-1 se expresa de manera constitutiva y cabe anotar, un poco más acentuada, en los osteoblastos. De hecho, ellos son la mayor fuente de SDF-1 en la BM, es por esto que se conjetura que los osteoblastos juegan un papel importante en esta teoría de movilización de las HSCs (56). Datos recientes refuerzan esta hipótesis ya que se ha demostrado que el tratamiento con G-CSF inhibe la expresión de SDF-1 en los osteoblastos a nivel del mRNA y dado que estos aportan una parte importante del SDF-1 en la BM, un efecto de este tipo podría tener gran importancia en la movilización (5, 39). Esta evidencia que podría proporcionar otra vía para la regulación de la movilización por parte de SDF-1 diferente a la acción de las

enzimas, pero algunos reportes recientes cuestionan el papel real de los osteoblastos en la movilización, argumentando que la disminución de la expresión de SDF-1 podría ser un hallazgo coincidental que no juega un papel importante dentro del mecanismo de movilización (57, 58).

Mirándolo desde este punto de vista, cualquier evento que tenga lugar tras la administración del G-CSF podría ser circunstancial y no estar directamente relacionado con el fenómeno de movilización, o al menos no ser enteramente responsable de este. Es por esto que la tendencia de los nuevos hallazgos se inclina hacia una teoría de complementariedad, más que a una absolutista que le atribuya un solo evento toda la dinámica de la movilización.

4.3 MOVILIZACION POR EFECTO DIRECTO DEL G-CSF SOBRE EL G-CSFR

El objetivo de este capítulo sobre movilización es recolectar toda la información posible con respecto a la acción del G-CSF sobre su receptor en las HSCs CD34+.

El número de G-CSFRs aumenta a medida que las células maduran en el linaje mieloide y los neutrófilos son las células que mayor número de receptores tienen (50-500 por célula). Sólo una minoría de estos receptores necesita estar ocupado para desencadenar una respuesta biológica máxima (59). Es así como, la ausencia de respuesta a G-CSF en ratones deficientes del receptor de G-CSF (G-CSFR) le da solidez a la teoría de que un pool mínimo de células funcionales con respuesta normal a G-CSF es crítico para la movilización (60).

La actina es una proteína que participa en varios procesos celulares incluyendo motilidad celular, contracción del citoesqueleto, división celular, señalización celular y movimiento de organelos y vesículas. La HSC debe atravesar primero por unos cambios en la polimerización de la actina para adquirir una conformación que le permita salir de la BM atravesando los vasos sanguíneos (61). Sabiendo que la polimerización

de la actina es una característica típica de la movilización en células influenciadas por un quimioattractante, tanto endógeno como exógeno, un estudio quiso determinar la actividad de la actina al exponer las HSCs al factor y se observó que el G-CSF es capaz de inducir cambios rápidos en la polimerización, dentro de los 10 minutos siguientes a la adición del factor. Los resultados de este estudio muestran que el G-CSF no sólo ocasionó un incremento en la señal de polimerización de la actina sino que se observó, a través de microscopía confocal, la formación de una concentración de actina en forma de anillo alrededor de la membrana de las células en cuestión, conformación típica de las células movilizadas (62).

Para demostrar la actividad del G-CSF como quimioattractante de HSCs, un grupo de investigadores diseñó un estudio con dos cámaras dobles divididas por una membrana, en un lado se depositaban HSCs y en la cámara del otro lado agregaban SDF-1 (proteína que mantiene y atrae las HSCs al estroma) ó G-CSF. La tasa de migración con el G-CSF excedió con creces una tasa de migración espontánea (1×10^4 células), fue mayor para el G-CSF que para el SDF-1 y demostró ser dependiente de tiempo. Los resultados del porcentaje de células que migraron a los diferentes tiempos de medición con el factor así lo confirman: 0, 12 ± 0.8 , 18 ± 1.4 , 20 ± 1.2 y $20 \pm 1.6\%$. Para corroborar que la atracción se debía al factor, se agregaron anticuerpos neutralizantes de G-CSFR y CXCR4 (el ligando de SDF-1), y la migración disminuyó sustancialmente con los anticuerpos anti-G-CSFR pero no con los anti-CXCR4, lo que no sólo confirma el efecto del factor sobre su receptor sino que también pone en tela de juicio una de las teorías expuestas anteriormente con respecto al papel esencial de la disminución del SDF-1 en la movilización.

A partir del ensayo anterior se podría concluir, no sólo que el G-CSF sí tiene un efecto directo como quimioattractantes en ausencia de enzimas de neutrófilos o quimiocinas secretadas por el estroma, sino que la fuerza con la que el SDF-1 atrae las células para que se queden en estroma (anidamiento) no es tan determinante, pero otros ensayos

como los discutidos anteriormente en el capítulo de quimiocinas o el que viene a continuación desvirtúan esta teoría.

Recientemente se encontró que la Carboxipeptidasa M, una proteasa unida a membrana, dependiente de zinc y que puede degradar SDF-1 α , se expresaba en HSCs CD34+ movilizadas. El G-CSF incrementa significativamente la expresión de la proteasa a nivel génico y proteico, sugiriendo que el clivaje de SDF-1 por carboxipeptidasa M es necesario para atenuar la respuesta quimioattractante hacia el estroma de la BM y facilitar la movilización inducida por G-CSF de las células de PB a BM (63).

4.4 MOVILIZACION POR ACTIVACION DE LAS VIAS DE SEÑALIZACION JAK/STAT Y OTRAS TEORIAS

Siguiendo con la línea del experimento anterior, tanto por el tema de la molécula de adhesión (SDF-1) como por el de la regulación transcripcional y la cascada de señalización que desencadena la unión G-CSF/G-CSFR, Semerad y col encontraron que el mRNA de SDF-1 en células de BM se reduce significativamente durante la movilización con G-CSF (64) sugiriendo, por un lado, que la expresión de SDF-1 es regulada a nivel del mRNA y por el otro que quizás haya un efecto modulador por parte del factor no sólo en las CMHs sino en células del estroma que tengan el receptor, como podría ser el caso de las Células Madre Mesenquimales, de comprobarse de manera experimental que estas expresan el receptor.

Se ha demostrado a través de estudios que el G-CSFR por ser un receptor de citoquinas de clase I, activa la vía Janus Kinasa/Traductores de Señales y Activadores de Transcripción (JAK/STAT) (65), que en mamíferos, es el principal mecanismo de señalización para una amplia gama de citoquinas y factores de crecimiento (G-CSF

incluído). La activación de JAK estimula la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis de las células (66).

Básicamente la dinámica de esta vía consiste en la unión de las citoquinas (G-CSF en este caso) a receptores homo u heterodiméricos (G-CSFR) al que se adhieren las JAKs. Casi de manera simultánea las JAKs son activadas por fosforilación (adición de un grupo fosfato ó PO_4) y estas a su vez fosforilan al receptor, permitiendo que las STATs también se peguen al receptor (ya fosforilado) y se fosforilen. Por último las STATs se transportan a núcleo donde se incorporan al DNA y así regulan la expresión de genes (67).

Para esclarecer los mecanismos moleculares del G-CSFR en la quimiotaxis por efecto del G-CSF, investigadores realizaron un estudio que consistió primero en agregar a las células piridona 6 (P6) un inhibidor de la vía JAK/STAT que redujo de manera efectiva la migración inducida por el G-CSF. Luego realizaron otro estudio en el que al analizar los resultados obtenidos por diferentes técnicas pudieron demostrar que el G-CSF causó la fosforilación fuerte de JAK1 y STAT3 dentro de los 5 minutos siguientes al estímulo con G-CSF (62), sin embargo una comprensión completa de los mecanismo de señalización del G-CSF requeriría de estudios complementarios.

5. CONCLUSIONES

El desarrollo de agentes movilizadores de CMHs como el Filgrastim ha tenido un gran impacto en el tratamiento de muchas enfermedades, para las cuales el Filgrastim es el agente movilizador de elección. Este ha sido objeto de intensa investigación durante los últimos 10 años, durante los cuales se ha tratado de determinar su mecanismo de acción para plantear nuevas terapias, evaluar sus efectos adversos y posibilitar el desarrollo de fármacos más eficaces. Fruto de estas investigaciones sobre el mecanismo de acción del Filgrastim son las teorías que se han expuesto a lo largo de este trabajo.

En la actualidad, paralelamente a la investigación que busca descifrar los mecanismos por los que actúa el G-CSF, se realiza también investigación para mejorar las condiciones de movilización, disminuir la toxicidad, reducir el tiempo y los efectos secundarios. Para este fin se está combinando la utilización del G-CSF con moléculas relacionadas con las teorías de movilización, por ejemplo se está intentando amplificar la respuesta del G-CSF usando moléculas como: AMD3100 (antagonista del CXCR4), anticuerpos anti-VLA-4 ó anti-VCAM-1, y citoquinas como IL-1 e IL-7 que también inducen la movilización. Esto refleja la importancia que tienen y tendrán en un futuro las Células Madre y por ende la optimización de los proceso de obtención de estas.

Con respecto a las teorías que se manejan en este momento sobre la movilización por el G-CSF, es claro que todas las vías hasta ahora descubiertas se ven en cierta medida impactadas por el factor. El orden en el que esto ocurre todavía es una gran incógnita. Aún falta por determinar si la movilización es ocasionada por una cadena de eventos cuyo sutil orden, al verse alterado, tiene como consecuencia los resultados a veces ambiguos y confusos expuestos previamente, o más bien, eventos que tienen lugar en simultánea y requieren los unos de los otros, como engranajes de una máquina, para lograr la movilización.

Esta revisión ha mostrado que el G-CSF induce cambios en el perfil de adhesión de las células en relación con el nicho hematopoyético, bien sea por efecto directo sobre su receptor, indirecto a través de las células de estroma, las enzimas secretadas por los neutrófilos o por las moléculas de adhesión previamente descritas.

Está de más decir que aunque falta mucho por descubrir en este campo, la utilidad de la técnica de movilización en la medicina impulsará la investigación hasta que sean determinados con exactitud cada uno de los pasos que debe dar la célula desde la médula para llegar hasta la sangre periférica.

BIBLIOGRAFIA

1. Schofield R. The relationship between the Spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; (4): 7-25.
2. Panoskaltsis N, Mantalaris A, Wu D. Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo. *J. Biosci. Bioeng* 2005; (100): 28-35.
3. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005; (121): 1109-1121.
4. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 2008; (8): 290-301.
5. Cashen AF, Lazarus HM, Devine SM. Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF? *Bone Marrow Transplantation* 2007; (39) 577–588.
6. Dellatore S, Garcia A, Miller W. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion. *Current Opinion in Biotechnology* 2008; (19): 534–540.
7. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003; (21): 759-806.
8. Piacibello W, Gammaitoni L, Pignochino Y. Proliferative senescence in hematopoietic stem cells during ex-vivo expansion. *Folia histochemica et cytobiologica* 2005; (4): 197-202.
9. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat.Res* 1961; (14): 213–22.
10. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; (290):1775–79.

11. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; (94): 4080–85.
12. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, et al.. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; (401): 390–94.
13. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat. Embryol* 1999; (199): 391–96.
14. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; (410): 701–5.
15. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; (26): 469–476.
16. Perez LE, Rinder HM, Wang C, Tracey JB, Maun N, Krause DS. Xenotransplantation of immunodeficient mice with mobilized human blood CD34⁺ cells provides an in vivo model for human megakaryocytopoiesis and platelet production. *Blood* 2001; (97): 1635–43.
17. MacKey, M.C. Cell kinetic status of haematopoietic stem cells. *Cell. Prolif* 2001; (34): 71–83.
18. Negrin, R.S, Atkinson K, Leemhuis T, Hanania E, Juttner C, Tierney K, Hu W, Johnston L.J, Shizurn JA, Stockerl-Goldstein KE et al. Transplantation of highly purified CD34⁺ Thy-1⁺ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2000; (6): 262–271.
19. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. An hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984; (33):157–65.

20. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; (92):12240–44.
21. Zheng YZ, Zhang L, Wang HJ, Han ZC, Takahashi TA. Differential expression of a homing-related molecule repertoire among umbilical cord blood, mobilized peripheral blood and bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2004; (12): 736-9.
22. Yang Z, Lu SH, Li YH, Liu B, Wang HJ, Jia HR, Zheng YZ. Differential study on the in vivo homing potential of human hematopoietic stem/progenitor cells from different sources in xenotransplanted NOD/SCID mouse model. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2007; (6):391-5.
23. Pelus L, Broxmeyer H. Chemokine axes in hematopoietic stem cell mobilization. *Chemokine Biology – Basic Research and Clinical Application, Volume II.* Birkhäuser Basel Editorial. Copyright 2007. Pg 129-138.
24. Welte K, Platzer E, Lu L, Gabilove JL, Levi E, Mertelsmann R, Moore MA. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci* 1985; (82): 1526-1530.
25. Platzer E, Oez S, Welte K, Sandler A, Gabilove JL, Mertelsmann R, Moore MA, Kalden JR. Human pluripotent hemopoietic colony stimulating factor: activities on human and murine cells. *Immunobiology.* 1986 (35):185–193.
26. Souza LM, Boone TC, Gabilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, Bruszewski J, Lu H, Chen KK, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 1986; (4746): 61–65.
27. Bronchud MH, Scarffe JH, Thatcher N, Crowther D, Souza LM, Alton NK, Testa NG, Dexter TM. Phase I/II study of recombinant human granulocyte colony-

- stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1987; (6): 809–813.
28. Gabilove JL, Jakubowski A, Fain K, Grow J, Scher H, Sternberg C, Yagoda A, Clarkson B, Bonilla MA, Oettgen HF, Alton K, Boom T, A Itrock B, Welte K, Souza L. Phase I study of granulocyte colony-stimulating factor in patients with transitional cell Carcinoma of the urothelium. *J Clin Invest* 1988; (4): 1454–1461.
29. Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1994; (179): 1677–1682.
30. Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1983; (258): 9017–23.
31. Welte K, Gabilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood* 1996; (151): 1907-1929.
32. Morstyn G, Dexter TM, Foote MA. Filgrastim (r-metHuG-CSF) in Clinical Practice. New York. Marcel Dekker, Inc. 1998. Parte 1 Pg 41-60.
33. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994; (6):1737-46
34. Panopoulos A, Watowich S. Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine* 2008; (42): 277–288.
35. Hakansson L, Ho glund M, Jo nsson UB, et al. Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil and eosinophil adhesion. *Br J Haematol* 1997; (98): 603–611.

36. Touw IP, van de Geijn GJ. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. *Front Biosci* 2007; (12): 800–15.
37. O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SE, Ward AC. Cytokine receptor signaling through the Jak/Stat/Socs pathway in disease. *Mol Immunol* 2007; (44): 2497–506.
38. Nicola NA, Peterson L. Identification of distinct receptors for two hemopoietic growth factors (granulocyte colony-stimulating factor and multipotential colony-stimulating factor) by chemical cross-linking. *J Biol Chem* 1986; (26): 12384-12389.
39. Christopher M, Liu F, Hilton MJ, Long F, Link D. Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood* 2009; (7): 1331-1339.
40. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci* 2006; (10): 589-95.
41. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003; (111):187–196.
42. Aguirre M, Juaristi J, Alvarez, M, Espada T, Brandan N. Expresión de moléculas de adhesión asociadas al anidamiento y movilización en células hemopoyéticas injuriadas: HCAM (CD 44) y metaloproteínasa (MMP-2). UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2003; Resumen: M-072.
43. Papayannopoulou T, Nakamoto B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 intergrin. *Proc Natl Acad Sci* 1993 (90): 9374–9378.

44. Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule- 1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 2001; (98):1289-1297.
45. Zanjani ED, Flake AW, Almeida-Porada G, Tran N, Papayannopoulou T. Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function. *Blood* 1999; (7): 2515-22.
46. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Williams B, Winkler IG, Simmons PJ. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol* 2002; (30): 440–449.
47. Pelus LM, Bian H, King AG, Fukuda S. Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRO β /CXCL2 and GRO β /CXCL2 Δ 4. *Blood* 2004; (103): 110–119.
48. Levesque J-P, Liu F, Simmons PJ, Betsuyaku T, Senior RM, Pham C et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood* 2004; (104): 65–72.
49. Christopher MJ, Link DC. Regulation of neutrophil homeostasis. *Curr Opin Hematol* 2007; (14):3–8.
50. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk Tet al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999; (283): 845–848.
51. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; (3): 687–694.

52. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999; (10): 463-471.
53. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 2003; (102): 2728-2730.
54. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med.* 2005; (201) :1307-1318.
55. Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, Kawamoto H, Tachibana K, Iizasa H, Katsura Y, Kishimoto T, Nagasawa T. A cell-autonomous requirement for CXCR4 in longterm lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc Natl Acad Sci* 1999; (96): 5663–5667.
56. Nervi B, Link D, DiPersio J. Cytokines and Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006; (99):690–705.
57. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; (25): 977-988.
58. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004; (20): 707-718.
59. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991; (78): 2791–2808.
60. Thomas J, Liu F, Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* 2002; (9):183-189.

61. Ogaeri T, Eto K, Otsu M, Ema H, Nakauchi H. The actin polymerization regulator WAVE2 is required for early bone marrow repopulation by hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2009; (5):1120-9.
62. Zhang Y, Cheng G, Yang K, Fan R, Xu Z, et al. A novel function of granulocyte colony-stimulating factor in mobilization of human hematopoietic progenitor cells. *Immunology and Cell Biology* 2009; (87): 428–432.
63. Marquez-Curtis L, Jalili A, Deiteren K, Shirvaikar N, Lambeir AM, Janowska-Wieczorek A. Carboxypeptidase M expressed by human bone marrow cells cleaves the C-terminal lysine of SDF-1{alpha}: another player in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization? *Stem Cells* 2008; (26): 1211–1220.
64. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I et al. G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 2005; (106): 3020–3027.
65. Marino VJ, Roguin LP. The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates Jak/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line. *J Cell Biochem*. 2008; (5):1512-23.
66. Rawlings J, Rosler K, Harrison D. The JAK/STAT signaling Pathway. *Journal of Cell Science* 2004; (117): 1281-1283.
67. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber R. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 2002; 109 Suppl. S121-S131.