



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-ZARAGOZA

EFFECTO DEL (CasNa) EN LA HEMATOPOYESIS  
MEDULAR Y EXTRAMEDULAR DE RATONES BALB/c

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**  
P R E S E N T A  
Q.C VANIHAMN DOMÍNGUEZ MELÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: D.R. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO.

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Zaragoza) UNAM; bajo la dirección del DR. Edelmiro Santiago Osorio y la supervisión del comité tutorial integrado por los doctores María de Lourdes Mora García y Alejandro Marché Cova

Durante la realización del presente trabajo de investigación se contó con el apoyo del Programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 183160 y del Programa de Becas para el Estudio de Posgrado UNAM.

La realización de la investigación fue apoyada por el proyecto PAPIIT IN 214903-2 de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA)

## AGRADECIMENTOS

AL DR. Edelmiro Santiago Osorio, por su infinita paciencia y apoyo para la realización de esta tesis.

A la DRA. Leticia Moreno Fierros, por su apreciable aportación para la obtención de los resultados de esta tesis.

Al Dr. Alejandro Marché Cova y DRA. Maria de Lourdes Mora García. Por sus consejos para mejorar la calidad de la investigación.

A mi colega el Biólogo Osvaldo Silvestre Santana, por su camaradería en el laboratorio y su amistad.

## INDICE

TEMA	PAGINA
I.-ABREVIATURAS	1
II.-RESUMEN	2
ABSTRACT	4
III.-INTRODUCCIÓN	
• Células Tallo Hematopoyéticas	5
-Modelos Hematopoyéticos	
• Microambiente Hematopoyético	9
• Ontogenia hematopoyética	12
• Hematopoyesis Extramedular	15
-hematopoyesis hepática	
-hematopoyesis esplénica	
• Factores de Crecimiento	19
• Trastornos Hematopoyéticos	25
• Biomoléculas activadoras de la Hematopoyesis	28
• Citometría de flujo	30
IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
V.- OBJETIVOS	34
VI.- HIPÓTESIS	35
VII.-MATERIAL Y MÉTODO	36
VIII.-RESULTADOS	39
IX.-DISCUSIÓN	53
X.-CONCLUSIONES	57
XI.-APENDICE	58
XII.-BIBLIOGRAFÍA	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

BrdU	Bromodeoxiuridina.
CasNa	Caseinato de sodio
CFU	Unidades formadoras de colonias
CFU-S	Unidades formadoras de colonias del bazo
HSC	Células tallo hematopoyéticas
LT-HSC	HSC reconstituyente a largo plazo
ST-HSC	HSC reconstituyente a corto plazo
MPP	Progenitor pluripotente
CLP	Progenitores linfoides comunes
CMP	Progenitores mieloides comunes
CPH	Célula progenitora hematopoyética
CFU-G	CFU de granulocitos
CFU-E	CFU de eritrocitos
CFU-MK	CFU de megacariocitos
CFU-GM	CFU de granulocito-macrófagos
CFU-preB	CFU de células B
CSF	Factor estimulador de colonias
GM-CSF	CSF de granulocito-macrófago
M-CSF	CSF de macrófago
G-SFC	CSF de granulocito
SCF	Factor de células tallo
TNF	Factor de necrosis tumoral
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
IFN- $\gamma$	Interferón gama
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
IL	Interleucina
Células NK	Células naturales asesinas
SFB	Suero Fetal Bovino
PBS	Solución estabilizadora de fosfatos

## RESUMEN

La generación de células sanguíneas, es un evento conocido como hematopoyesis el cual tiene origen en la médula ósea y es regulado por una serie de moléculas conocidas como citocinas las cuales regulan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Existe evidencia que la hematopoyesis puede ser regulada por biomoléculas diferentes a las citocinas tal es el caso del ácido retinoico (un análogo de la vitamina A), la vitamina E y el caseinato de sodio (CasNa, una sal de la caseína; principal proteína de la leche).

Nuestro equipo de trabajo ha mostrado, *in vitro*, que el CasNa induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de la línea celular hematopoyética de ratón 32D e inducción a la producción de anión superóxido, síntesis de M-CSF y TNF- $\alpha$  bioactivo, también acelera la conversión de neutrófilos en banda a segmentados. Esta serie de evidencias nos hacen pensar que el CasNa, pudiera tener efectos sobre la hematopoyesis *In vivo*. Por lo tanto en el presente estudio se evaluó el efecto del CasNa sobre la hematopoyesis medular y extramedular.

Los resultados indican que el CasNa, es capaz de activar la hematopoyesis medular ya que indujo la acumulación de células hematopoyéticas en la médula ósea puesto que la proteína inyectada intraperitonealmente aumenta en primer lugar el número de células totales y el número de células mononucleares. Posteriormente mediante el uso de marcadores específicos y citometría de flujo observamos en primer lugar proliferación de precursores de monocitos-macrófago, granulocitos, linfocitos T y B en médula ósea. El CasNa también activó la hematopoyesis extramedular. En segundo lugar observamos un aumento en el índice esplénico, acompañado de un aumento de células totales y mononucleadas así mismo, encontramos que la proliferación de las poblaciones de

**monocito-macrófago, granulocitos, linfocitos T y B fue similar a la observada en la hematopoyesis medular.**

**Nuestros resultados muestran que el caseinato de sodio, una sal de la caseína proteína principal de la leche, tiene influencia relevante sobre la hematopoyesis medular y extramedular in vivo.**

## ABSTRACT

The generation of blood cells is an event known as haematopoiesis and occurs in the bone marrow. It is controlled by a series of molecules known as cytokines, which regulate the proliferation and differentiation of the haematopoietic cells. There is evidence that hematopoiesis can be regulated by biomolecules other than cytokines, which is also true for retinoic acid (an analogue of vitamin A), vitamin E, and sodium caseinate, (CasNa, a salt of casein, the principal protein in milk).

Our work team has shown, *in vitro*, that CasNa induces the differentiation of the monocyte-macrophage haematopoietic cellular class in the 32D mouse and the production of the superoxide anion, synthesis M-CSF and bioactive TNF- $\alpha$ , and also accelerates the conversion of neutrophils in band segments. This evidence leads us to believe that CasNa could have this effect on haematopoiesis *in vivo*. The present study therefore evaluates the effect of CasNa on both medullary and extramedullary haematopoiesis.

The results indicate that CasNa is capable of activating medullary haematopoiesis because it induces the accumulation of haematopoietic cells in the bone marrow. The protein that was injected intraperitoneally augmented both the total number of cells and the number of mononuclear cells. Subsequently, through the use of special markers and flow cytometry, we observed the proliferation of granulocyte precursors, macrophages and lymphocyte T and B. CasNa also activated extramedullary haematopoiesis. We observed an augmentation of the spleen rate accompanied by an augmentation of both the total number of cells and the number of mononuclear cells. Also, the proliferation was similar to what was observed in the medullary hematopoiesis. Our results show that sodium caseinate, a salt of casein and the principal protein in milk, has notable influence over medullary and extramedullary haematopoiesis *in vivo*.

## INTRODUCCION

### CELULAS TALLO HEMATOPOYETICAS

Cerca de  $2 \times 10^{11}$  eritrocitos y  $10 \times 10^{10}$  leucocitos deben ser reemplazados día a día para mantener las defensas del cuerpo y una oxigenación correcta en el ser humano (1). El proceso de generación de células sanguíneas, es conocido como hematopoyesis y se lleva a cabo mediante células primitivas conocidas como células tallo hematopoyéticas HSC(2) (hematopoietic stem cells, por sus siglas en inglés). El proceso de la hematopoyesis puede ser descrito como un proceso jerárquico donde las células troncohematopoyéticas se encuentran hasta la cima posteriormente los progenitores los cuales dan paso al siguiente nivel de la jerarquía que son los precursores con una sola línea de comprometimiento y finalmente las células terminalmente diferenciadas que son las células maduras de los diferentes linajes. En condiciones normales la mayoría de las HSC se encuentran en estado quiescente (fase G0 del ciclo celular) y solo se dividen para mantener los niveles de la hematopoyesis en el organismo. Fenotípicamente, son células pequeñas con poco citoplasma no expresan marcadores de células maduras, sin embargo, el marcador más importante en humanos, encontrado en progenitores celulares tempranos pero no en su contraparte madura es el CD34 el cual es expresado en el 0.5-5% de las células de médula ósea (3,4), mientras que en ratón expresan al antígeno Thy 1.1<sup>lo</sup> Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> (5-7). Estas células primitivas tienen la capacidad de auto- perpetuarse o diferenciarse, son capaces de dar origen al menos a los 10 diferentes tipos celulares funcionales (neutrófilos, monocitos / macrófagos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, plaquetas, células dendríticas, linfocitos T y B y células asesinas naturales (NK)) (7). Dos tipos de HSC han sido identificadas de acuerdo a estudios de trasplante en modelos murinos, las reconstituyentes a largo plazo y las de corto plazo que presentan el inmunofenotipo Thy 1.1<sup>lo</sup> Lin<sup>-</sup>Sca<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>. Las primeras HSCs (LT-HSC por sus siglas en inglés, long-term hematopoietic stem cells) representan 0.005% del total de las células de médula ósea (3-7), y son capaces de autorrenovarse

indefinidamente y reconstituyen la hematopoyesis para toda la vida (8); las segundas HSCs (ST-HSC por sus siglas en inglés, short-term hematopoietic stem cells) y las cuales presentan el inmunofenotipo Thy 1.1<sup>lo</sup>Lin<sup>-</sup>Mac<sup>lo</sup>Sca<sup>+</sup>c<sup>-</sup>kit<sup>+</sup> que retienen la capacidad de auto-renovación y reconstitución de la hematopoyesis y sólo pueden autorrenovarse por un periodo de seis a ocho semanas (9-10) y dan lugar a los progenitores multipotenciales (MPP). Los MPP dan origen a los progenitores restringidos de oligolinaje, originando directamente todos los linajes sanguíneos y pueden autorrenovarse por un periodo menor a dos semanas, reconstituyen además compartimentos linfoides o mieloides por un corto periodo de tiempo (9). Por lo tanto, una posible jerarquización de las células pluripotenciales quedaría así LT-HSC ---- ST-HSC ---MPP (10, 11).

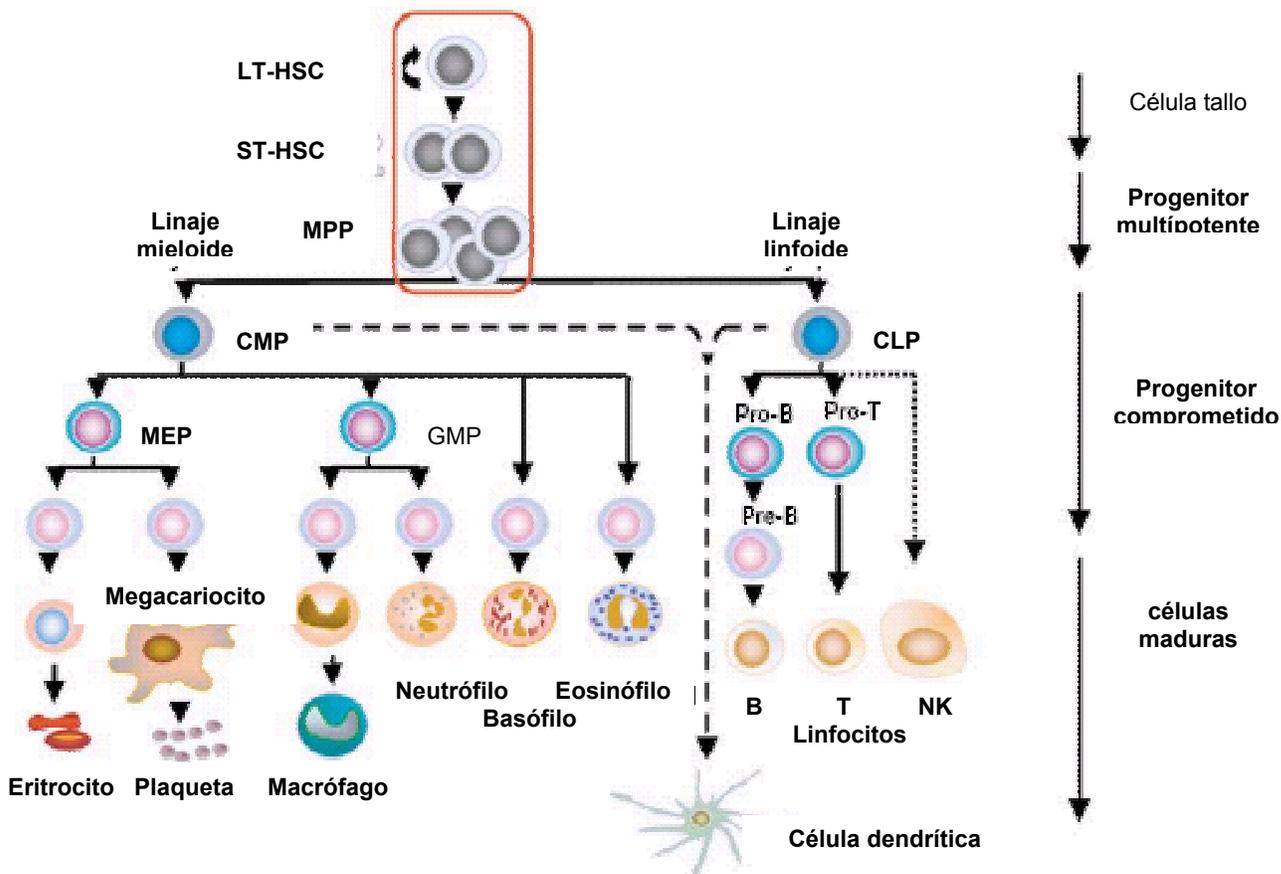
Estudios posteriores ayudaron a soportar la idea de que la jerarquización no solo llegaba hasta ahí si no que iba mas abajo. De los MPP descienden los precursores comunes mieloides (CMP) y los precursores comunes linfoides (CLP) (12-15). Las células comprometidas hacia determinado linaje también conocidas como unidades formadoras de colonias (CFU) y que son derivadas de los CMP y CLP pueden ser de granulocitos (CFU-G), eritrocitos (CFU-E), megacariocitos (CFU-MK), granulocito-macrófagos (CFU-GM), células B (CFU-preB), (CFU-Ba) basófilos, (CFU-Eo) eosinófilos y células dendríticas (CFU-Dc) (13, 16, 17), son células que darán origen a las progenitoras maduras, dependiendo del linaje al que pertenecen. (Figura 1).

### **Modelos hematopoyéticos**

En la actualidad existen dos modelos que han sido propuestos para el mantenimiento de la hematopoyesis. El primer modelo dice que un número fijo de células hematopoyéticas son mantenidas durante la embriogénesis. Estas células son sucesivamente y fortuitamente recicladas para que se llevan a cabo la proliferación y diferenciación de células maduras. Aquí las células proliferan pero perdiendo progresivamente la capacidad de autorrenovación (18). En el segundo

modelo sugiere que un pequeño número de células troncales desarrolladas durante la embriogénesis son capaces de poder producir y llevar a cabo una extensa autorrenovación, llevándose de la siguiente manera; produciendo una célula hija con la misma capacidad proliferativa y otra con ya comprometida. Una pequeña porción de estas células pueden llevar a cabo entonces la maduración y diferenciación hematopoyética. Por lo tanto no existe una tendencia mayor por el segundo.

## CASCADA HEMATOPOYÉTICA



**Figura 1** Jerarquía de las células hematopoyéticas. LT-HSCs, células tallo reconstituyentes a largo plazo; ST-HSCs, células tallo reconstituyentes a corto plazo; MPP, progenitores multipotentes; CMP, progenitores mieloides comunes; CLP, progenitores linfoides comunes; MEP, progenitores megacariocitos-eritrocitos; GMP, progenitores granulocitos-macrófagos. Las poblaciones pluripotentes encerradas en un círculo expresan los marcadores:  $Lin^{-}$ ,  $Sca-1^{+}$  y  $c-kit^{+}$  (Tomado de Larsson & Karlsson, 2005 ref 18).

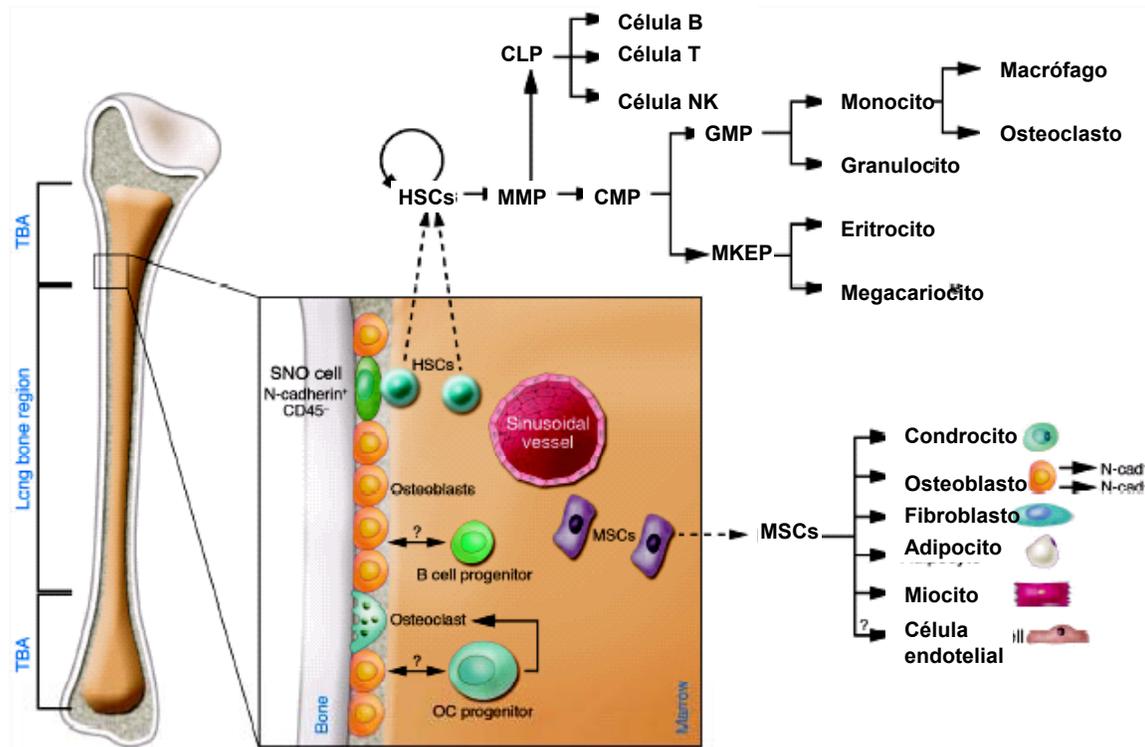
## MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO

La regulación de las células tronco hematopoyéticas es gobernada por dos entidades íntimamente relacionadas. Uno es la expresión de genes y el otro es la composición de señales externas del el microambiente de la médula ósea. Los factores de transcripción que son señales internas que regulan la expresión de genes, junto con señales externas provenientes del microambiente de la médula ósea pueden ser mediadas ya sea por interacciones célula- célula, matriz extracelular-célula y por factores solubles llamados factores de crecimiento. Estas interacciones junto a estos factores dan como resultado la promoción o inhibición de la proliferación, ya sea indicando a la célula a estar en estado quiescente, diferenciarse, migrar, entrar en apoptosis o en el peor de los casos que lleve acabo una transformación maligna( larson). El microambiente hematopoyético es el lugar donde se lleva acabo la hematopoyesis. El nicho hematopoyético consta de células en diferentes estadios incluyendo preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos así también fibras de colágeno células endoteliales y depósitos minerales tales como el calcio y fosfato. El desarrollo de las células tallo dentro de la cavidad ósea es mantenida por muchas células maduras. Las células hematopoyéticas y su progenie esta rodeada por células estriales así como células mesenquimales que también residen en a médula ósea y se ha propuesto que dan la mayoría de los linajes celulares que se encuentran en la médula ósea incluyendo los condorcitos, osteoblastos, fibroblastos, adipositos, células endoteliales y monocitos (Figura 2). El nicho medular es un sitio donde el tejido adulto y las células tallo residen y llevan acabo su renovación o gran parte de su diferenciación. Estructuralmente el nicho esta formado por células soportadoras que proveen un microambiente para las células tallo así como por las señales celulares de las células soportadoras. La médula ósea esta compuesta principalmente de células hematopoyéticas encasilladas dentro del hueso. Una porción de estas células hematopoyéticas puede ser encontrada cerca de la superficie del hueso las cuales están linearizadas con los osteoblastos. Este arreglo anatómico sugiere que existe una comunicación reciproca entre estos dos

tipos celulares y un rol potencial por parte de los osteoblastos. Esta noción es soportada ya que se ha demostrado que los osteoblastos son capaces de formar múltiples factores de crecimiento hematopoyéticos. Las células tallo hematopoyéticas y las células endoteliales son derivadas de un mismo progenitor llamado hemangioblasto en el estado embrionario y son íntimamente relacionadas para la ontogenia de la hematopoyesis que ocurre en el saco vitelino, zona aortagonada-mesonefrotica, placenta, hígado fetal, bazo y médula ósea adulta.

El microambiente que se desarrolla en la médula ósea es esencial para retener a las células progenitoras y las células tronco hematopoyéticas o en un ambiente que permita llevar a cabo sus procesos de proliferación, diferenciación y comprometimiento adecuados en cada momento (18) (Figura 2). El microambiente hematopoyético está constituido por un conjunto de células del estroma y células accesorias, así como sus productos (citocinas de la matriz extracelular etc.) capaces de asistir a las células tallo hematopoyéticas (HSC) y su progenie a modular su estado quiescente, la autorrenovación, comprometimiento, proliferación, maduración y apoptosis de células hematopoyéticas más maduras (19,20). En la actualidad existe un debate sobre la existencia de una célula tronco común para la hematopoyesis y el estroma medular. Independientemente de este hecho, parece claramente establecida la existencia de una célula stem del estroma. Estas serían las células CD34- adherentes al plástico, de aspecto fibroblástico y con gran capacidad proliferativa. Estas colonias muestran gran variabilidad en tamaño y morfología de las células que las componen; algunas con aspecto de fibroblastos otras parecen iniciar la matriz de mineralización, otras son capaces de acumular grasas etc. Sin embargo, al igual que sucede con la hematopoyesis no todas las células del estroma con capacidad clonogénica son multipotentes. Las células que componen el estroma celular son básicamente células reticulares de las cuales hay dos tipos que son las adventicias y las fibroblásticas estas últimas forman una red en la cavidad medular y sintetizan las fibras de la matriz extracelular y numerosas citocinas. Los adipocitos a medida que el ser humano va envejeciendo, van ocupando la mayor parte de la cavidad medular actúan como soporte físico de la hematopoyesis y también secretan

algunas citocinas actúan sobre las HSC por contacto directo pero además sintetizan proteínas que constituyen la matriz extracelular (21,22).



**Figura 2** En la médula ósea las HSCs residen cerca de los osteoblastos sobre el nicho endosteal o adyacentes a las células endoteliales de las vesículas sinusoidales. Sobre cada división, 1 célula hija deja el hueso para proliferar y diferenciarse hacia varios linajes. Las HSCs y su progenie están rodeadas por células estromales derivadas de las células tallo mesenquimales (MSCs), quienes también residen en la cavidad ósea. Las MSCs dan origen a condrocitos, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, endotelio y miocitos. Tomado de Yin & Li, 2006.

## **ONTOGENIA HEMATOPOYÉTICA:**

Durante la embriogénesis de los vertebrados la hematopoyesis se lleva a cabo en diferentes sitios. Esto se refleja por las diferentes demandas del desarrollo del organismo. Se ha especulado mucho en que lugar se lleva a cabo la primera demanda hematopoyética pero se ha observado que uno de los primeros lugares es la región aorta-gonada-mesonefros (AGM) (Medvinsky 1993) y en segundo lugar en el saco vitelino que contiene muchos eritrocitos inmaduros, macrófagos y megacariocitos (Gordon 1992, Natio 1996, Xu 2001). Estas células son diferentes de sus contrapartes maduras. Los eritrocitos aun son nucleados, los macrófagos están en *by pass* al estadio de monocito y sintetizan diferentes enzimas, los megacariocitos muestran una acelerada producción de plaquetas y una reducida ploidia. Estas diferencias son necesarias para el embrión por las diferentes demandas ya que en primer lugar existe una gran demanda de oxígeno, una alta protección para una posible infección y sangrado. No se ha podido observar una actividad repobladora de células tronco hematopoyéticas en el saco vitelino en este estadio, ya que se han transplantado células troncales del saco vitelino a ratones irradiados letalmente y no se ha podido observar una repoblación. Sin embargo las células tronco hematopoyéticas, son capaces de una reconstitución a largo plazo, cuando están en un estadio cercano al alumbramiento, sugiriendo que las células troncohematopoyéticas del saco vitelino necesitan de un microambiente especial para poder tener un crecimiento (Yoder 1997).

Posteriormente el desarrollo de la hematopoyesis se lleva a cabo a nivel dorsal, primordialmente en la región AGM. Estas células presentan una multipotencialidad eritroide, mielóide y linfocítica y son capaces de poder crecer en recipientes adultos con capacidad multilineal (Medvinsky 1996). La presencia de la hematopoyesis es solo pasajera en la región AGM y presenta muchas células tronco hematopoyéticas (Godin, Garcia 1999). Últimamente la aparición de células con capacidad repobladora en recipientes adultos provenientes de la región AGM se han observado tanto en el saco vitelino como en el hígado. (Huang 1993, Medvinsky 1996, Muller 1994), durante muchos años los investigadores han creído que los islotes sanguíneos del saco vitelino, contiene células tronco

hematopoyéticas capaces de producir hematopoyesis primitiva y de migrar para desarrollarse en el hígado o iniciar la hematopoyesis final. Cambiando la idea del origen de la hematopoyesis en el saco vitelino, se ha propuesto que el sitio mejor ubicado para células tronco hematopoyéticas intraembrionicamente es la región AGM. Las células troncales se encuentran primero en la región AGM y posteriormente migran hacia el saco vitelino y al hígado fetal y bazo (Figura 3). Ya cerca del nacimiento las células tronco hematopoyéticas migran del hígado hacia la médula ósea la cual es la responsable de la hematopoyesis adulta. Sin embargo una migración secuencial no ha sido demostrada directamente in vivo en las especies mamíferas. En si la evidencia para esta observación esta basada en la cuantificación temporal de la actividad hematopoyética en el saco vitelino y el hígado. La migración es interferida debido a que en ese estado los precursores son detectables de manera significativa en el torrente sanguíneo (de laus cunmano 1996). En este modelo, la presencia de un grupo de células tronco hematopoyéticas en el saco vitelino, con la habilidad de crecer en hospederos neonatales antes de la región AGM, no se ha tomado en consideración.

Es posible que las células tronco hematopoyéticas se originan en al menos dos sitios independientes y las células endoteliales tanto de la región AGM y del saco vitelino puedan ser precursores de células hematopoyéticas. Inclusive una cerrada yuxtaposición temporalmente paralela se ha sugerido para el origen de las células tronco hematopoyéticas ya sean provenientes tanto de la región AGM y del saco vitelino. La idea de un precursor común para el linaje endotelial y hematopoyético emergió hace algunos años atrás y ha sido revisada en la última década (murria 1932, robb elefante 1998, robertson 1999). La evidencia que enfatiza la intrincada relación entre estos dos linajes, incluye la observación de que los genes que afectan la hematopoyesis primitiva codifican para el receptor de las tirocinas cinasas el Flk-1 el cual esta involucrado directamente con la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis (shalaby 1995, 1997). En los humanos esto ha sido confirmado ya que células vasculares endoteliales aisladas de hígado fetal y, médula ósea son capaces de llevar acabo

hematopoyesis multilinaje. (oberlin 2002). Aunque estos resultados no son regla existe la posibilidad de que el hígado y la médula ósea colonizadas por células angio-hematopoyéticas de la región AGM, dando esto una interesante posibilidad de una participación directa de compartimientos fijos del estroma medular y hepático en el desarrollo celular.

Existen dos modelos que han sido propuestos para el mantenimiento de la hematopoyesis. El primer modelo dice que un número fijo de células hematopoyéticas son mantenidas durante la embriogénesis. Estas células son sucesivamente y fortuitamente recicladas para que lleven acabo la proliferación y diferenciación de células maduras. Aquí las células proliferan pero perdiendo progresivamente la capacidad de autorrenovación. (brecher 1986). En el segundo modelo sugiere que un pequeño número de células troncales desarrolladas durante la embriogénesis son capaces de poder producir y llevar acabo una extensa autorrenovación, llevándose de la siguiente manera; produciendo una célula hija con la misma capacidad proliferativa y otra con ya comprometida. Una pequeña porción de estas células pueden llevar acabo entonces la maduración y diferenciación hematopoyética. Por lo tanto no existe evidencia definitiva para apoyar estos dos modelos aunque existe una tendencia mayor por el segundo modelo. Por otro lado

## **HEMATOPOYESIS ESPLENICA Y HEPATICA**

El origen de las células hematopoyéticas empieza a edad muy temprana esto es alrededor de la tercera semana de desarrollo embrionario, las células mesodérmicas situadas en la pared del saco vitelino se diferencian en células llamadas hemangioblastos, formando grupos y cordones aislados (cúmulos angiogénicos celulares) que gradualmente se van canalizando por confluencia de las hendiduras intercelulares. Las células centrales dan origen a las células primitivas, en tanto las de la periferia se aplanan y forman las células endoteliales que revisten los islotes sanguíneos.

La hematopoyesis hepática se desarrolla a partir de la sexta semana hasta el nacimiento, a pesar de que la eritropoyesis predomina debido a la alta demanda de oxígeno, se pueden detectar también células de la serie granulocítica y megacariocítica. La actividad del hígado disminuye gradualmente en los últimos meses de vida intrauterina y el momento del nacimiento solo restan ya pequeños islotes hematopoyéticos. La hematopoyesis esplénica se desarrolla en el mismo periodo que la hepática aunque su contribución es menor, ambos órganos son importantes para el desarrollo de la linfopoyesis. A partir de la onceava semana se establece la hematopoyesis médular del cual termina siendo el órgano definitivo. Durante los dos primeros años de vida la médula ósea activa (médula roja) se localiza en todos los huesos y gradualmente es remplazada por tejido medular inactivo (médula amarilla). La expansión del tejido hematopoyético finaliza en la infancia. Y en situaciones de necesidad de incremento o demanda hematopoyética se produce una expansión de la médula roja hacia la médula grasa e inclusive se lleva a cabo extramedularmente como en el bazo y el hígado (23,24).

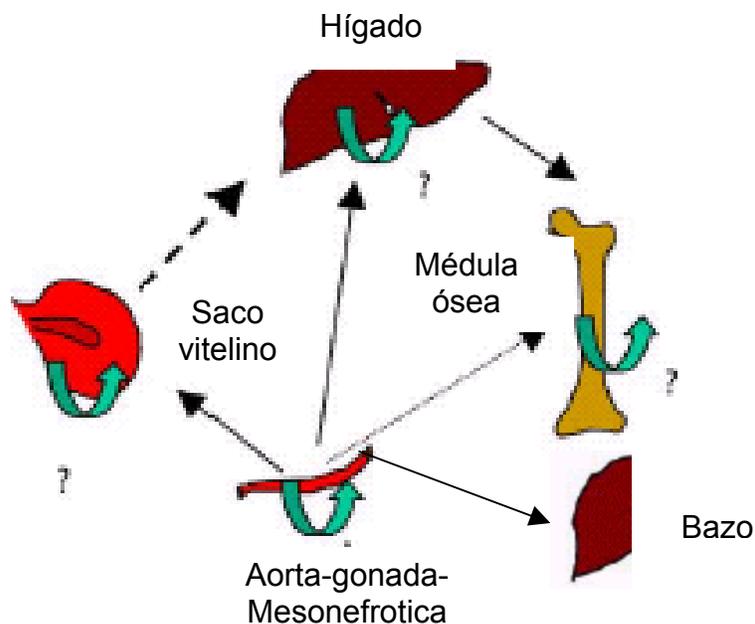


FIGURA 3.- Origen de las diferentes fuentes de células hematopoyéticas en la etapa gestacional. Tomado de (1)

## HEMATOPOYESIS EXTRAMEDULAR

Como ya mencionamos la médula ósea es el órgano hematopoyético primario que reúne todas las características y cuenta con el microambiente necesario para la producción de células sanguíneas (25), no obstante, el bazo juega un papel muy importante en la hematopoyesis secundaria y puede llegar a ser fundamental (26). Se ha demostrado que participa de manera determinante en la reconstitución hematopoyética de ratones letalmente irradiados (27). La hematopoyesis extramedular en los órganos hematopoyéticos secundarios en particular el bazo, refleja la propiedad de las células hematopoyéticas inertes de volverse activas si son estimuladas (28). Así entonces el bazo es un órgano que puede participar de manera activa en la hematopoyesis llegando incluso a suplir las funciones de la médula ósea (29).

El bazo es un órgano linforreticular, altamente vascularizado, que desempeña varias funciones, inmunológicas y no inmunológicas. El bazo pesa entre 150 y 200g en el humano adulto normal y mide unos 12 cm aproximadamente de longitud por 7cm de ancho. Se halla situado en el hipocondrio izquierdo con una orientación oblicua en relación con la cavidad abdominal (30) (Figura 3). Esta rodeado por una cápsula de tejido conectivo y se halla constituido por dos tipos de estructuras denominados pulpa blanca y pulpa roja. La pulpa roja contiene los sinusoides esplénicos, que son cavidades vasculares llenas de sangre que se intercomunican unas con otras dejando entre si el parénquima esplénico que forman los cordones de *billroth* que están delimitados a su vez por células reticulares. La pulpa blanca contiene arteriolas en su zona central rodeadas por linfocitos T, alrededor de las cuales se halla la zona folicular, constituida por centros germinales que contienen linfocitos B y Macrófagos. Los folículos linfoides del bazo son llamados corpúsculos de *Malpighi* (31,32).

En el bazo adulto humano es posible visualizar un pequeño número de células hematopoyéticas. La literatura soporta que estas células son derivadas de células tallo circulantes y que toman residencia para llevar a cabo su diferenciación en el bazo, o son células ya maduras que son atrapadas dentro del bazo sin excluir que estos eventos puedan llevarse al mismo tiempo (33-35).

Cuando elementos benignos de la médula ósea son encontrados en números elevados en bazo, este fenómeno es conocido como hematopoyesis extramedular o también suele ser referido como metaplasma mieloide. La hematopoyesis extramedular es en sí el resultado de condiciones que interrumpen el microambiente hematopoyético de la médula ósea, facilitando la salida de progenitores y precursores celulares, dando como consecuencia un incremento de células medulares tanto maduras como inmaduras en la circulación. La hematopoyesis extramedular puede darse por un amplio rango de condiciones esplénicas con variación de condiciones hematológicas benignas, neoplasmas hematopoyéticos, tumores no hematopoyéticos y algunos otros desórdenes del bazo y la circulación (33-45).

El ambiente esplénico es situado únicamente como un sitio de hematopoyesis extramedular esto debido a que es muy parecido al microambiente estromal de médula ósea dando así un ambiente favorable para que las células precursoras y progenitoras puedan sobrevivir (37,39).



## FACTORES DE CRECIMIENTO

El control de la hematopoyesis es regulado por una serie de glicoproteínas de bajo peso molecular (menos de 32kDa), llamadas citocinas (46) . Aunque existen muchos tipos de células productoras de citocinas, dentro del sistema inmune natural los macrófagos son las células mas comprometidas en la síntesis de citocinas mientras que en sistema inmune específico las células T colaboradoras son las que se encargan de la producción de citocinas. Dentro de las citocinas se agrupan las interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento, factores de necrosis tumoral (47), estos moduladores ejercen su actividad de manera autócrina, parácrina o endócrina, con efectos variables tales como modulación de respuesta inmune, el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas, la regulación tisular y la angiogénesis entre otros (47).

Los cultivos *In Vitro* del tejido hematopoyético a largo plazo han permitido establecer que la hematopoyesis se sostiene debido a que las células del estroma secretan diversas citocinas tales como las interleucinas (IL) ( IL 1a, IL1b, IL-2, IL-7, IL-10, IL13, entre otras). Los diferentes factores estimuladores de colonias (CSF) que han sido estudiados durante los últimos 30 años, contribuyen esencialmente al desarrollo de los 8 linajes celulares hematopoyéticos (48). Estos incluyen al factor estimulador de colonias de macrófagos (FEC-M) el factor estimulador de colonias granulocíticas (FEC-G) el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (FEC-GM), el factor estimulador de células tallo (FECT), factor de necrosis tumoral (FNT) o factor de crecimiento transformante (FCT) (49) y el factor estimulador de colonias múltiples mejor conocido como Interleucina 3 (IL-3) estos factores tienen un amplio efecto en la función biológica de varios tejidos y células. Sobre todo los FEC's intervienen en la supervivencia, proliferación, diferenciación y modulan la funcionalidad (quimiotaxis, dé granulación, activación, adhesión, citotoxicidad, cambios fenotípicos y la expresión

de mRNA) de varias poblaciones de células maduras y sus precursores (48). (Tabla 1)

Para que los factores de crecimiento hematopoyéticos puedan ejercer sus efectos deben unirse a receptores específicos sobre células blanco (50-53). La formación del complejo ligando-receptor trae como consecuencia el desencadenamiento de señales intercelulares a través de la activación de tirocinas cinasas, dando como resultado final la activación celular y una determinada respuesta biológica, estos receptores cuentan con un dominio extracelular, un dominio intramembranal y un dominio citoplasmático. Estos receptores están involucrados en dos grupos principales que son: Los receptores de la gran familia de las tirocin cinasas (RTC) y los receptores de las citocinas (RC) (48). Donde los receptores de tirocin cinasa tienen un dominio citoplasmático con una actividad de tirocina cinasa, la cual es responsable de iniciar las señales intracelulares. Para los receptores de citocinas aun no se les conoce un sitio evidente de actividad tirocina cinasa, sin embargo la unión de su ligando induce fosforilación de tirocina de varias fosfoproteínas celulares (54).

Con la activación de las tirocinas cinasas, inicia la cascada de transducción de señales produciendo ciertos tipos de respuesta intracelular dependiendo de la célula. Los receptores tirocin cinasa tienen un dominio extracelular el cual desencadena cascada abajo una serie de señales intracelulares. La unión del ligando receptor promueve la dimerización del receptor y una subsecuente activación la actividad intrínseca de la tirocina cinasa, que lleva a la transfosforilación de residuos tirocin específicos en la región intracelular del receptor desencadenado una serie de mensajeros los cuales actúan cascada abajo para finalmente activar factores de transcripción, los cuales son encargados de activar ciertos genes encargados de llevar a cabo una función específica según el tipo celular.

Por otro lado las tirocinas cinasas también activan las células B promoviendo su proliferación y activación. Así mismo también intervienen en la respuesta celular específica, la intervención en la reacción de inflamación ya sea aguda o crónica, en el control de los procesos hematopoyéticos de la médula ósea y en la respiración tisular

<b>TABLA 1 – CITOCINAS (47).</b>			
<b>Citocina</b>	<b>Peso Molecular (Kd)</b>	<b>Origen</b>	<b>Principales efectos</b>
<b>INTERLEUQUINAS</b>			
IL1- $\alpha$ IL-1- $\beta$	15-17	Monocitos- Macrófagos	Fiebre (pirógeno endógeno), sueño, anorexia, inflamación, expresión de CD 54 en las células endoteliales y liberación del factor tisular, activación linfocitaria, producción de IL-6 Y CSF.
IL-2	15	Células T	Induce la proliferación de la célula T, coestimula la proliferación y diferenciación de la célula B,
IL-3	14-28	Células T, Mastocitos,	Potencia a las NK y LAK (agresoras activadas por linfoquinas)
IL-4	20	Células T, Mastocitos	Induce la proliferación del mastocito, proliferación de la célula hematopoyética pluripotencial
IL-5	45	Células T, mastocitos	Induce la proliferación de la célula T y la generación de LTC, coestimula la proliferación de la célula B, sinergiza con la IL-3 en la proliferación del mastocito, estimula la producción de Ig E e Ig G 4, induce la expresión y liberación de CD 23, la clase II del CMH en la células B, cambia de T <sub>H</sub> a T <sub>H2</sub> .
IL-6	23-30	Monocitos, Fibroblastos	Induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de Ig A
IL-7	25	Células de la médula ósea y del estroma tímico	Pirogénica, induce la proliferación de plasmocitomas e hibridomas, aumenta la producción de Ig, la clase I en los fibroblastos, acción con la IL-2 en la producción de Proteínas de Fase Aguda por los hepatocitos, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de la célula hematopoyética, induce la diferenciación del LTc. Induce la

			proliferación de las células pro y pre B de los linfocitos inmaduros
IL-8 (quimiocina)	6.5	Monocitos, células endoteliales, macrófagos alveolares, fibroblastos.	Induce la quimiotaxis y activación de neutrófilos y células T.
IL-9	30-40		
IL-10	17-21	Células T	Induce la proliferación de algunas células T, potencia la proliferación del mastocito inducida por la IL-3.
IL-11	24	Células T, células B activadas y monocitos.	Inhibe la activación del MAC, estimula la producción de célula B y la producción de Ac, estimula los mastocitos y cambia de T <sub>H</sub> a T <sub>H2</sub> .
IL-12	75	Células del microambiente hematopoyético	Estimula la producción de Ac, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de megacariocitos, estimula los progenitores del macrófago.
IL-13	10	Monocitos, macrófagos, algunas células B y mastocitos.	Activa a las NK para secretar IFN-gamma, cambia T <sub>H</sub> a T <sub>H1</sub> , inhibe la producción de Ig E inducida por la IL-4.
IL-14	?	Células T	Induce la proliferación y diferenciación de células B e inhibe la producción de IL-1.
IL-15	14-15	Células B y macrófagos	Induce la secreción de Ig E.
IL-16	56	Células T	Induce la proliferación de la célula B
IL-17	20-30	Células no linfoides, musculares	Induce la proliferación y citotoxicidad de las células de las NK, diferenciación de la célula NK.
IL-18	?	Células endoteliales y monocitos.	Inmunomodulatoria.
<b>INTERFERONES</b>			
IFN-α	18-20	Linfocitos	Coestimula la producción de la célula T, induce la secreción de la IL-6, IL-8 y G-CSF a partir de las células endoteliales, epiteliales y fibroblástica.
IFN-β	20	Fibroblastos y células amnióticas	Incrementa la expresión de antígenos de clase I y II HLA. Y la actividad de células NK. Induce el factor Inductor del IFN-gamma similar a la IL-1.

IFN- $\gamma$	20-25	Linfocitos CD 4+ y CD 8+, células NK y Th 1.	Posee efectos antivirales e inmunomodulatorios. Es quimiotáctico para monocitos y aumenta en ellos la expresión de HLA clase I.
<b>FACTORES DE NECROSIS TUMORAL (TNF)</b>			
TNF- $\alpha$ (caquectina)	17	Fibroblastos, células NK, neutrófilos, astrocitos, células endoteliales y células del músculo liso.	Proinflamatorio, antitumoral. Agente neovascularizante y estimulante de la resorción ósea.
TNF- $\beta$ (linfotóxina)	25	Linfocitos T	Idem anterior.
<b>FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS (CSF)</b>			
GM-CSF	14-35	Células T, endoteliales, macrófagos, y fibroblastos	Estimulación de proliferación y diferenciación de precursores mieloides, potencia las funciones de neutrófilos y monocitos maduros (lisis y fagocitosis)
G-CSF	18-22	Monocitos-macrófagos, células endoteliales, células T, neutrófilos y fibroblastos.	Estimula la proliferación y diferenciación de la línea de granulocitos neutrófilos. Estimula la actividad de PMN maduros.
M-CSF	70-90	Monocitos-macrófagos, células endoteliales y fibroblastos.	Estimulación de diferenciación de precursores hemopoyéticos hacia la línea monocítica . Funcionalidad de monocitos y macrófagos maduros.
Eritropoyetina	30	Células intersticiales peritubulares renales, hígado y macrófagos de médula ósea.	Regula la producción de eritrocitos en condiciones normales y recuperación post anémica.
Trombopoyetina	18-70	Hígado, riñón y músculo liso. En menor proporción en bazo y células.	Estimula la proliferación y la diferenciación de las células progenitoras megacariocíticas . Aumenta la producción plaquetaria .
<b>FACTORES ESTIMULADORES DEL CRECIMIENTO</b>			

PDGF		Plaquetas	Activa la activación plaquetaria, principalmente actúa regulando mecanismos de adherencia .
TGF- $\alpha$	5-20	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales	Induce la proliferación de los progenitores de los granulocitos y de los monocitos, activa a los macrófagos, aumenta producción de Leucotrienos en el eosinófilo, actividad tumoral del monocito. Induce la proliferación del granulocito.
TGF- $\beta$	25	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales	Induce la proliferación de monocitos
FGF		Tejido conectivo	Proliferación de fibroblastos, síntesis de colágena y macromoléculas de matriz intersticial
EGF		Células de lámina basal epidermal	Crecimiento y diferenciación de epitelios
ILGF-1 ILGF-2	55-70	Hígado y células del sincitiotrofoblasto respectivamente	Promueve proliferación y diferenciación de múltiples tejidos contribuyendo al desarrollo corporal postnatal y embrionario.
<b>QUIMIOCINAS</b>			
C (carece del primer y tercer residuo cisteína conservados) Ej: LINFOTAXINA (LPTN)	Variable	Plaqueta, placenta, riñón, hueso, células T y B,	Induce la angiogénesis , la proliferación de los queratinocitos, la resorción ósea y la proliferación tumoral.
C-C varios ej: MIP-1a, RANTES, MIP-1b, EOTAXINAS, MCP-1 Y MCP-3	Variable	CD8 activados, mastocitos	Induce la quimiotaxis de las células Ty NK
CXC (varios ej: IL-18, IP-10, SDF.	Variable		Induce la quimiotaxis de las células T, NK, basófilos y eosinófilos.

(Tomado y modificado de Aguirre de Avalos y Illaria Bellantuono.)

## **TRANSTORNOS HEMATOPOYETICOS.**

La interacción ligando-receptor da como resultado la activación de señales bioquímicas. Estas señales bioquímicas termina activando de factores transcripción y consecuentemente la expresión de productos proteicos de genes específicos, que mantiene la sobrevivencia, disparan la proliferación o promueven la diferenciación hacia células sanguíneas maduras. Sin embargo, la regulación de la hematopoyesis puede presentar alteraciones en las diferentes fases, que resulten en modificaciones cuantitativas y funcionales en las poblaciones de células hematopoyéticas.

Alteraciones como mutaciones, traslocaciones o inversión de genes, de los cuales sus productos regulan la proliferación, diferenciación o sobrevivencia celular, resultan en la generación de moléculas de señalización anormales o un incremento en la expresión de proteínas reguladoras. Estos genes anormales son referidos como oncogenes, y sus contrapartes normales referidos como proto-oncogenes. Los oncogenes contribuyen a la transformación maligna promoviendo una proliferación descontrolada, bloqueo en la diferenciación normal o en la prevención de la apoptosis. En contraste a los oncogenes, los genes supresores de tumor codifican proteínas que regulan negativamente la proliferación. La inactivación funcional de ambas copias de un gen supresor de tumor mediante perdida o mutación, es comúnmente requerida para promover la transformación maligna. Entonces, los genes supresores de tumor son genéticamente recesivos en la transformación, mientras que los oncogenes son dominantes (55-57).

El desequilibrio en la hematopoyesis se traduce en serios problemas hematológicos, en las enfermedades neoplásicas de todo tipo, incluidos los síndromes mielodisplásicos y también los trastornos mieloproliferativos, el carácter distintivo de su crecimiento los constituye la proliferación aberrante, de tipo clonal de las células que los originan (58-61).

La proliferación clonal es la consecuencia de una serie de mutaciones somáticas adquiridas que confieren a las células transformadas una capacidad de multiplicación mucho mayor que la que posee sus contrapartes normales (61).

Uno de estos trastornos hematopoyéticos es la leucemia mieloide aguda LAM, esta enfermedad es considerada como un grupo heterogéneo de padecimientos caracterizado por un incontrolada proliferación de células hematopoyéticas neoplásicas acompañado con un daño en la producción de células hematopoyéticas normales dando como consecuencia neutropenia, anemia y trombocitopenia (61).

El objetivo principal del tratamiento antineoplásico es erradicar la clona leucémica y restablecer la hematopoyesis normal en la médula ósea. Este objetivo se hace cada vez más posible pero va siempre unido a efectos secundarios dependiendo del tratamiento. Dentro de los aspectos importantes a tomar en cuenta, cuando se planea el tratamiento de un paciente con LAM se encuentran (61-65):

1. Clasificación biológica de la leucemia en base a inmunofenotipo, citogenética y alteraciones genéticas moleculares.
2. Definición de grupos de riesgo en base a factores de impacto pronóstico conocidos.
3. Evaluación de enfermedad mínima residual para la redefinición de remisión completa y selección de tratamientos de acuerdo a esta.
4. Uso de nuevas drogas y esquemas con dosis altas de quimioterapia.
5. Inmunoterapia.
6. Tratamientos dirigidos a blancos moleculares
7. Avances en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas
8. Purga de médula ósea.

Sin embargo estos métodos no son 100% efectivos trayendo como consecuencia la muerte del paciente en diferentes lapsos de tiempo.

En los últimos 20 años la investigación clínica del tratamiento contra la leucemia se ha concentrado principalmente en incrementar las dosis de fármacos citotóxicos con el objetivo de inducir muerte de las células leucémicas. Aunque estas formas de tratamiento han incrementado el porcentaje de curación en poblaciones seleccionadas también se asocian con toxicidad en forma temprana o tardía y adicionalmente los enfermos considerados con mal pronóstico difícilmente se curan.

## BIOMOLÉCULAS ACTIVADORAS DE HEMATOPOYESIS

Como ya hemos mencionado, los factores de crecimiento hematopoyético regulan la hematopoyesis *in vivo* como *in vitro* controlando la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas (66-68), sin embargo existe evidencia de que estas glicoproteínas no son las únicas que pueden influir en la hematopoyesis, ya que existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta a las citocinas que afectan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, tal es el caso de la vitamina E (69), la vitamina A (70,71) y el ácido retinoico (ATRA), miembro de la familia de las hormonas esteroideas (72,73), así mismo la caseína principal proteína de la leche y su sal el caseinato de sodio (74-77).

La leche y los productos lácteos son base de la dieta humana. La leche bovina representa una de las fuentes de alimento de más consumo a nivel mundial. La leche bovina está constituida por 3.6 % de proteínas, 4.1% de grasas, 5.0% de carbohidratos y menos del 1% de vitaminas y minerales y un 86% de agua. De la fracción proteica compuesta por alfa-lactalbúmina, beta-lactalbúmina y caseína, esta última es el principal componente con un 80%. La caseína se encuentra en forma de micelas, conformada por cuatro cadenas polipeptídicas designadas como alfa-s1 caseína, alfa-s2 caseína, beta-caseína y k-caseína. La caseína cuando es diluida en álcali produce caseinatos, uno de ellos es el caseinato de sodio (74).

Desde hace más de 30 años se publicó que la eliminación de caseína en la dieta de ratas provocó mielosupresión (73), además provoca una producción deficiente de eritrocitos a consecuencia de la reducción en la producción de eritropoyetina (74), la inyección de caseinato de sodio a la cavidad peritoneal de ratón, además de movilizar granulocitos y macrófagos, también induce acumulación de actividad estimuladora de colonias en suero y exudado de la cavidad peritoneal (75-77), posteriormente en otra investigación se observó que la

inyección subcutánea de caseína permite la supervivencia de ratones inyectados con dosis letal de bacterias, actividad que se debe a la elevación de los niveles del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) el cual activa a los granulocito-neutrófilos para eliminar a las bacterias (78). Nuestro grupo de investigación demostró que el caseinato de sodio (CasNa) acelera la diferenciación de neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares (79), además reduce la proliferación e induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de las células 32D (una línea hematopoyética multipotencial dependiente de interleucina-3 y ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis) (80), posteriormente publicamos que la diferenciación morfológica se acompaña de la inducción a la expresión del gen del M-CSF y su receptor (M-CSFR) (81), además hemos mostrado que la adición de CasNa al cultivo de la línea leucémica mielomonocítica WEHI-3 de ratón, bloquea su proliferación celular, pero no existen la expresión del M-CSF y su receptor (82). Por otro lado también se han obtenido resultados de que el CasNa además de incrementar el índice esplénico en ratones tratados intraperitonealmente con la proteína, aumenta también el tamaño de los centros germinales (83).

Datos preliminares producidos por nuestro equipo indican que la adición de CasNa al cultivo de células de médula ósea de ratón (células hematopoyéticas normales), en presencia de IL-3, se observa una consistente inducción a la proliferación, incluso tenemos evidencia de que la inyección intraperitoneal de CasNa incrementa el, índice esplénico, así como el tamaño de los centros germinales (83), por lo que este dato sugiere que el CasNa puede inducir la hematopoyesis *in vivo*.

## CITOMETRÍA DE FLUJO

La tinción inmunofluorescente mediante la incorporación de 5-bromodeoxiuridina (BrdU) y el análisis citométrico provee una técnica de alta resolución que sirve para determinar la frecuencia y naturaleza de células individuales que han sintetizado DNA. En este método el BrdU (un análogo del nucleótido de timidina) es incorporado al DNA nuevo de células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. El BrdU incorporado es teñido con un anticuerpo específico para el BrdU, así los niveles de BrdU incorporado a la célula pueden ser monitoreados por el citómetro. El BrdU es compatible con el uso de anticuerpos fluorescentes específicos de otras moléculas celulares. Estas moléculas incluyen antígenos de superficie o proteínas intracelulares.

Para poder analizar las poblaciones existentes tanto en bazo como en médula ósea se analizaron las células mononucleadas obtenidas de ambos órganos mediante citometría de flujo. Esto fue mediante la adición de anticuerpos específicos celulares marcados con anticuerpos fluorescentes (FITC, PE O PerCP). Las células se marcaron de la siguiente manera:

Macrófagos: CDF4/80 (PE)/ BrdU (FITC)

Granulocitos: Ly-6G (PE)/ BrdU (FITC)

Granulocitos Macrófagos: CD11b (PE)/ BrdU (FITC)

Linfocitos T: CD3 (PerCP)/ BrdU (FITC)

Linfocitos B: CD220 (PerCP)/ BrdU (FITC)

MARCADOR DE CELULAS MACROFAGICAS (F4/80): el anticuerpo monoclonal BM8 reacciona con el antígeno F4/80 de ratón, una proteína transmembranal, de aproximadamente 125kDa. El antígeno F4/80 está expresado por la mayoría de los macrófagos maduros y es el mejor marcador para esta población celular. Sin embargo otro tipo de células tales como las de Langerhans y de Kupffer han sido reportadas con este antígeno. La expresión del F4/80 comienza durante el desarrollo temprano de las células mieloides con aproximadamente el 30% de las

células de médula ósea. Se ha demostrado que algunas citocinas regulan la expresión del F4/80, dando como resultado la marca del antígeno en una subpoblación de macrófagos, especialmente en un microambiente linfoide in vivo.

**MARCADOR DE GRANULOCITOS (Ly-6G):** el RB6-8C5 reacciona con un epítipo común en Ly-6G y Ly-6C. Previamente conocido como Gr-1 un antígeno de diferenciación mieloide. En médula ósea el nivel de expresión del antígeno esta directamente correlacionado con la diferenciación y maduración de los granulocitos. En la periferia el anticuerpo RB6-8C5, reconoce granulocitos (neutrófilos y eosinófilos).

**MARCADOR DE CÉLULAS GRANULOCITICAS Y MACROFAGOS (CD11b):**

El anticuerpo Mi/70 reacciona con la cadena  $\alpha_M$  de 170kDa de MAC-1 (integrina, CD11b/CD18  $\alpha_M \beta_2$ ). El cual es conocido como un receptor complemento (CR3) el cual es mediador en la adhesión para C3bi e ICAM-1 (CD54). MAC-1 el cual es expresado en varias etapas de granulocitos y macrófagos. La expresión de MAC-1 es rápidamente regulada por neutrófilos después de ser activados. En humanos se ha observado en células monocíticas y polimorfonucleares.

**MARCADOR DE LINFOCITOS T (CD3):** El anticuerpo IF4(clona), reacciona con el receptor asociado al antígeno de superficie CD3 el cual es un conjunto de proteínas polipeptídicas unidas a la membrana, colectivamente se le denomina receptor de células T (TCR), encontrado en los Timocitos y linfocitos T periféricos así como células T dendríticas.

**MARCADOR DE LINFOCITOS B (CD45R/B220):** Es un anticuerpo que reacciona con un epítipo de dominio extracelular de la glicoproteína CD45 la cual es dependiente en la expresión del exón A y residuos carbohidratos específicos. Esta es expresada en linfocitos B, en la mayoría de sus estadios a partir del pro-B, así

mismo también esta presente en células B activadas y su expresión es menor en células plasmáticas y un subconjunto de células B de memoria.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de los decesos en México, los tumores malignos ocupan una de las 5 principales causas de muerte. Entre los tumores malignos están las leucemias que son padecimientos que van en aumento a escala mundial. En nuestro país el número de pacientes se ha incrementado en forma significativa. Tan solo en 1998, se reportaron más de 600 casos nuevos, mientras que la tasa de sobrevivencia a 5 años es del 40 %, a pesar del uso de las nuevas estrategias terapéuticas como el trasplante de médula ósea y la terapia de diferenciación. La incidencia a nivel mundial: es de 1,5 casos por 100,000 habitantes/año. Su frecuencia aumenta con la edad. Comprende el 80 % de las leucemias agudas en adultos y del 15-20 % en niños (64,65).

Los tratamientos convencionales para la LMA ó LMC tienen como objetivo principal erradicar la célula neoplásica de la médula ósea y restaurar el funcionamiento normal (65). La mayoría de estos medicamentos son tóxicos para las células neoplásicas pero también para las normales con lo cual se compromete la vida del paciente, por lo que sigue vigente la necesidad de encontrar nuevas estrategias terapéuticas efectivas contra las células neoplásicas pero no agresivas contra las células normales hematopoyéticas.

Varios factores de crecimiento hematopoyético, miembros de la familia de las citocinas, se han empleado en el tratamiento de las neoplasias hematológicas porque ayudan en la recuperación de la hematopoyesis normal, sin embargo tienen efectos secundarios severos incluyendo la posibilidad de promover el crecimiento de las células neoplásicas.

En los últimos años se han descrito moléculas diferentes a las citocinas con actividad hematopoyética con gran relevancia terapéutica, como el caso de ácido retinoico, en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (86).

Recientemente nuestro grupo mostró que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína, también modula la hematopoyesis, particularmente, bloqueando la proliferación de líneas celulares mieloides normales (células 32D) y leucémicas (WEHI-3, P388 y J774) de ratón.

Como ya mencionamos tenemos evidencia de que el CasNa aumenta la proliferación *in vitro* de células hematopoyéticas normales cultivadas con IL3, además promueve la producción de M-CSF y su receptor, inhibe células tumorales y leucémicas e induce diferenciación a la serie macrófagica y granulocítica todo esto sin alterar la viabilidad de las células. Este conjunto de datos indican que el CasNa modula la hematopoyesis *in vitro*, pero no se conoce si lo hace *in vivo*.

La hipótesis de que el CasNa puede modular la hematopoyesis *in vivo*, parece tener sentido si consideramos que datos preliminares indican que la inyección de CasNa en ratones incrementa el índice esplénico y el tamaño de los centros germinales, así como el aumento en el número de células mononucleadas en médula ósea, todos parámetros que indican activación de la hematopoyesis.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del CasNa en la hematopoyesis medular y extramedular.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Evaluar si existe un incremento en la proliferación de células mononucleadas (CMN) normales de médula ósea y de Bazo en ratones tratados con CasNa
2. Identificar las poblaciones que proliferan tanto en médula ósea como en bazo.

## **HIPOTESIS**

Existen evidencias de que el CasNa una sal de la caseína principal proteína de la leche es capaz de inducir la proliferación *in vitro* de células hematopoyéticas provenientes de médula ósea de ratón. Induce el aumento del tamaño de los centros germinales de bazo e incrementa el índice esplénico. Por lo anterior se espera que la inyección de CasNa a la cavidad peritoneal del ratón pueda inducir la hematopoyesis *in vivo*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Población de estudio:** 12 ratones hembra *BALB-c* (obtenidos del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza) de 2 meses de edad, criados en condiciones de esterilidad, con agua y comida *ad libitum*.

### Equipo y Material

#### **Equipo**

1. Centrifuga DINAC B-D (Becton Dickinson and Company Parsippany NJ)
2. Microscopio óptico (American Optical Corporation)
3. Campana de flujo laminar (Veco. México)
4. Campana de madera con luz ultravioleta
5. Balanza granataria (Ohaus. Florham Park N.J. Capacidad de 2kg “5lb”).
6. Balanza analítica (Mettler H54 AR). Con capacidad máxima de 160 gramos
7. Incubadora (Termo Forma Series II, Ohio, USA)

#### Material

1. Micropipetas (20µl, 200µl y 1000µl)
2. Puntas para micropipetas (200µl y 1000µl)
3. Cajas Petri (5 y 10 ml)
4. Tubos cónicos de vidrio y plástico (5 y 10 ml)
5. Tubos Eppendorf (1 y 2 ml)
6. Matraz Erlenmeyer (500 y 1000 ml)
7. Probetas graduadas (500 y 1000 ml)
8. Vasos de precipitados (50, 250 y 500 ml)
9. Placas de 96 pozos (Corning NY, USA)
10. Estuche de disección
11. Hemacitómetro
12. Jeringas de insulina de 1 ml

## Reactivos

1. Colorante azul tripano (Sigma Chem USA)
2. Iscove's Modified Dulbecco's (Gibco BRL, USA)
3. Agua Milli-Q
4. Ficoll-Paque ( $\rho = 1.077\text{g/ml}$ )
5. Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco BRL, USA)
6. Caseinato de sodio (CasNa) (SIGMA. México)
7. Etanol al 70%

## Método

### Inyección a los ratones

1. Los ratones se dividieron en dos grupos de dos, al grupo control se le inyectó agua Milli-Q 1ml como vehículo y al segundo grupo se le inyectó 0.1g (100 mg.) de CasNa disuelto en 1 ml de agua Milli-Q.
2. Este tratamiento se realizó cada tercer día por un período de 6 días.

### Obtención de células mononucleadas

3. Después del tratamiento se sacrificaron los dos grupos de ratones por medio de dislocación cervical. Se obtuvieron los fémures y bazos. Esto se realizó en la campana de cultivo, previamente desinfectada con alcohol al 70% y esterilizada por 20 minutos con luz ultravioleta (UV): los fémures se colocaron en cajas petri con medio Iscove's.
4. Se cortaron las epífisis de cada fémur de los dos grupos evitando que se astillaran y con una jeringa de insulina de 1 ml con medio de Iscove's suplementado con SFB al 10% se extrajeron las células totales de médula ósea. La suspensión celular se centrifugó para obtener el botón celular de cada grupo, se resuspendieron en 2mL de medio Iscove's, SFB al 10% y se resuspendieron perfectamente y se colocaron cuidadosamente sobre Ficoll en tubos cónicos y se centrifugaron por 17 minutos a 500g. Posteriormente se lavaron y se contaron en hemocitómetro.

### Viabilidad y número celular

5. Se evaluó por medio de la incorporación de azul tripano (Sigma USA), con una dilución 1:1 con colorante azul tripano y se realizó el conteo de células vivas y muertas en el hemocitómetro.

### Obtención de células de Bazo

1.-Los bazos se envolvieron en un filtro elástico y se depositaron en cajas petri con medio ISCOVE'S, se exprimieron con un embolo de jeringa hasta liberar las células sanguíneas. La suspensión celular se centrifugó para obtener el botón celular de cada grupo, la cual se colocó en tubos con 2 ml de medio Iscove's, SFB al 10% y se resuspendieron contando el número celular. Se vació el resuspendido en tubos que contenían 1.5ml de Ficoll y posteriormente se centrifugarán por 20 minutos a 500 x g.

2.-Al finalizar éste período se obtuvo un anillo celular de cada muestra, el cual contenía a las células mononucleadas, éstas se lavaron dos veces con medio Iscove's y SFB al 10%, y finalmente se realizó el conteo directo de células mononucleadas.

### **MANEJO DE DATOS**

En el presente estudio se realizaron tres experimentos por separado. Los datos se presentaron como la media y la desviación estandar (+). Para observar diferencias significativas entre los datos se empleo un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de tukey ( $p < 0.05$ ) mediante el paquete estadístico SPSS.

## RESULTADOS

### EL CasNa AUMENTA EL NUMERO DE CELULAS DE MEDULA OSEA Y BAZO IN VIVO.

Resultados de nuestro laboratorio indican que el CasNa induce la proliferación de las células mononucleadas de médula ósea de ratón normal in vitro. En este trabajo se analiza si el CasNa también induce la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas de ratón normal in vivo en médula ósea y bazo. Con esta finalidad se inyectó CasNa en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c cada 48 hrs durante 6 días, al octavo día los ratones fueron sacrificados y el fémur y bazo extraídos.

El tamaño del bazo revelado por la morfología y por el índice esplénico (peso del bazo/ peso del ratón), fue mayor en ratones tratados con CasNa en relación con los inyectados con sólo agua inyectable (vehículo) ( Figura 4).

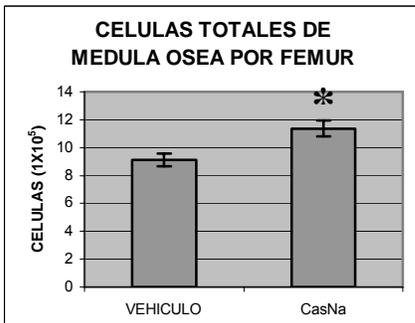


	Bazo Vehículo	Bazo CasNa
Índice esplénico	0.0041	0.0070*

Figura 4.- Fotografía del tamaño del bazo y aumento de su peso reflejado por el índice esplénico del ratón inyectado con CasNa en comparación con ratones inyectados con sólo agua inyectable (vehículo). (\* Diferencia significativa t de student  $P < 0.05$ ) en relación al vehículo.

Al evaluar el número de células totales (eritrocitos y células mononucleadas) obtenidas de médula ósea por fémur y por bazo de ratón, se encontró mayor cantidad en aquellos ratones inyectados con CasNa (Figura 5 A y B).

A)



B)

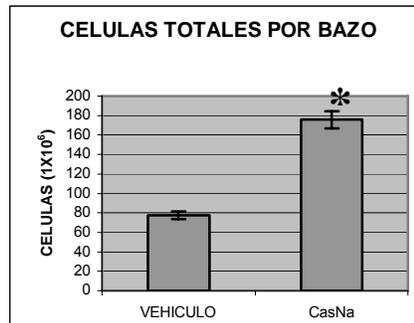
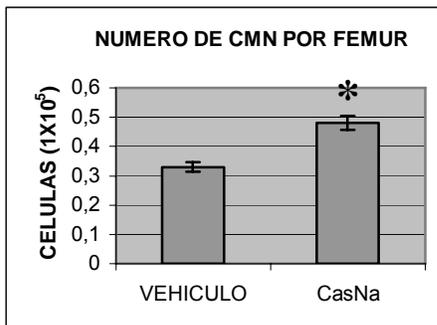


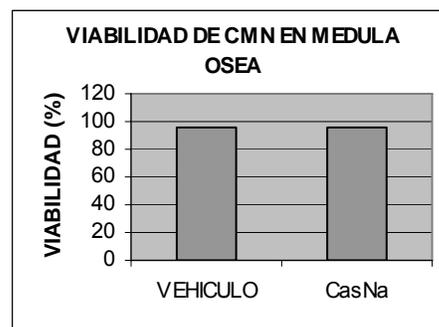
Figura 5.- Aumento del número de células totales de médula ósea (A) y bazo (B) de ratones tratados con CasNa. (\* Diferencia significativa t de student  $P < 0.05$ /) con relación al vehículo.

Al separar las células mononucleadas (CMN) a partir de las células totales, se encontró la misma relación; mayor cantidad de CMN de ratones inyectados con CasNa y sin cambios en la viabilidad celular (Figura 6 A , B, C y D). Adicionalmente tampoco encontramos evidencias de inducción a la apoptosis en CMN de médula ósea (Figura 7). (\* Diferencia significativa t de student  $P < 0.05$ )

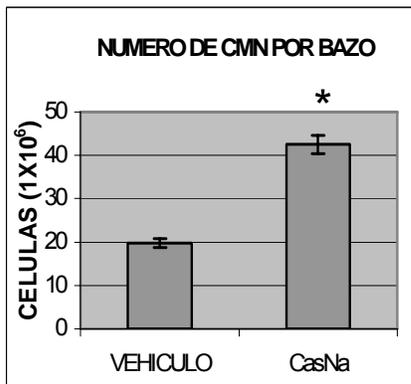
A)



B)



C)



D)

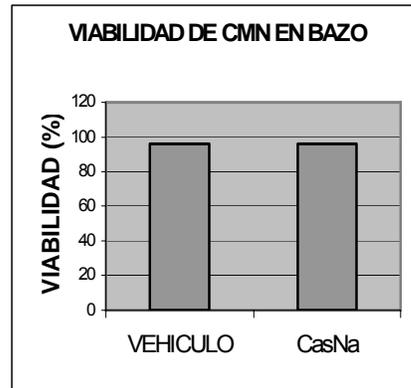
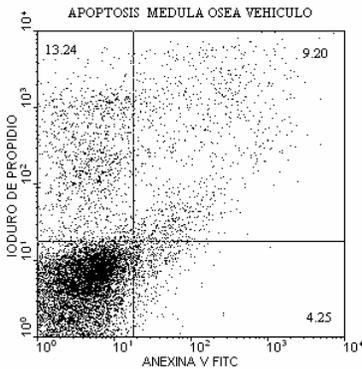


Figura 6.- Número (A) y porcentaje de viabilidad (B) de células mononucleadas obtenidas de médula ósea. Número (C) y porcentaje de viabilidad (D) células mononucleadas de bazo de ratones tratados con caseinato de sodio (CasNa), o solo vehículo (vehículo). (\* Diferencia significativa t de student  $P < 0.05$ ) en relación al vehículo.

A)



B)

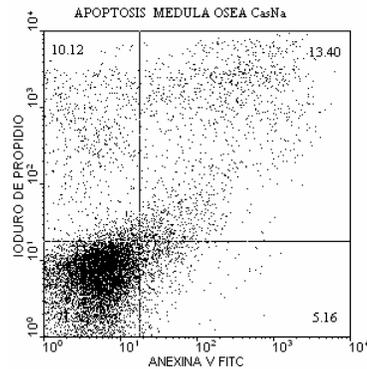


Figura 7.- Evaluación de apoptosis en CMN de ratones inyectados con sólo vehículo (A), o con CasNa (B).

## El CasNa AUMENTA LA PROLIFERACION DE CELULAS DEL LINAJE MONOCITO-MACROFAGOS, GRANULOCITOS, LINFOCITOS T y B EN BAZO Y MEDULA OSEA.

Para observar si el aumento en el número de células hematopoyéticas de bazo y médula ósea es consecuencia de una inducción a la proliferación acoplada a diferenciación, procedimos a inyectar intraperitonealmente cada 48 h con o sin CasNa durante 6 días, al séptimo día se inyectó a cada ratón 100  $\mu$ L de una solución que contiene 1 mg/mL de BrdU y se sacrificaron al 8<sup>o</sup> día. Las células mononucleadas de médula ósea fueron extraídas y marcadas con anticuerpos contra antígenos específicos para macrófagos (F4/80  $\rightarrow$  CD11b), granulocitos (Ly6G/GR-1), linfocitos B (CD45R /B220) y linfocitos T (CD3) para finalmente adicionarles anticuerpos contra BrdU. Para el análisis con el citómetro de flujo se seleccionaron las poblaciones correspondientes a Monocitos (A), Granulocitos (B) y Linfocitos T y B (C) dependiendo de su tamaño y granularidad (Figura 8 A, B y C ).

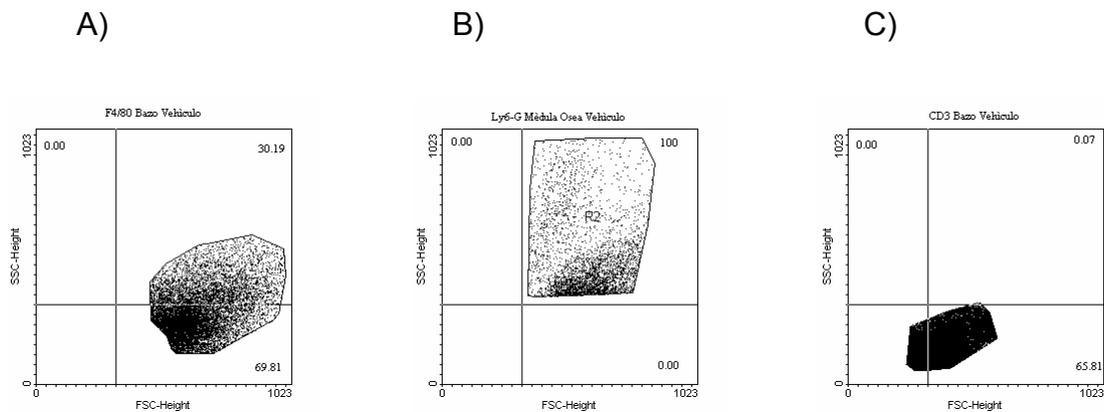


Figura 8.- Regiones seleccionadas y analizadas por el citómetro de flujo dependiendo de la granularidad y tamaño. A) Monocito- Macrófago; B) Granulocito; C) Linfocitos

## Proliferación del linaje monocito-macrófagos.

Una vez teñida la muestra con el anticuerpo anti-F4/80 específico para el linaje monocito-macrófago y el anti-BrdU procedimos a analizar los resultados. De la población total de las células (Figura 9 A), comparamos tamaño y granularidad con la positividad para el anticuerpo anti-F4/80 lo cual da idea de la posible inducción de diferenciación macrofágica (Figura 9 B). Los datos revelan que existe un incremento del doble del porcentaje (8.1) en bazo tratados con CasNa comparados con aquellos que solo reciben vehículo (Figura 9 B1 y B2). En cuanto a la médula ósea el incremento fue de 14.98 % en las muestras de ratones tratados con CasNa en relación a los que solo reciben vehículo (Figura 9 B3 y B4). Detectada la inducción de diferenciación macrofágica inducida por el CasNa en la población total, procedimos a analizar solo la población en la región macrofágica positiva al anti-F4/80 y al anticuerpo/anti BrdU (Figura 9 C), para detectar diferenciación acoplada a proliferación, nuestros resultados muestran un incremento de 15.28 % (Figura 9 C1 y C2) en bazo mientras que en médula ósea fue de 5.3 % (Figura 9 C3 y C4) en las muestras de ratones tratados con CasNa, comparados con aquellos que solo reciben vehículo. Finalmente procedimos a analizar la diferencia del porcentaje de la población positiva al anticuerpo anti-F4/80 proveniente de una división celular reciente revelado por la incorporación de BrdU. Los resultados indican que mas de la mitad en bazo y casi la mitad de médula ósea positiva a anti-F4/80 provienen de una reciente multiplicación celular (Figura 9 D1 y D2) y (Figura 9 D3 Y D4).

El anticuerpo anti-CD11b también es ampliamente usado para identificar poblaciones macrofágicas (103). El uso de este anticuerpo siguiendo el mismo procedimiento de análisis que con el anti-F4/80, se obtuvieron resultados similares (Figura 10). Este grupo de datos claramente indican que el CasNa induce proliferación y diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago.

Linaje monocito-macrófagos F4/80

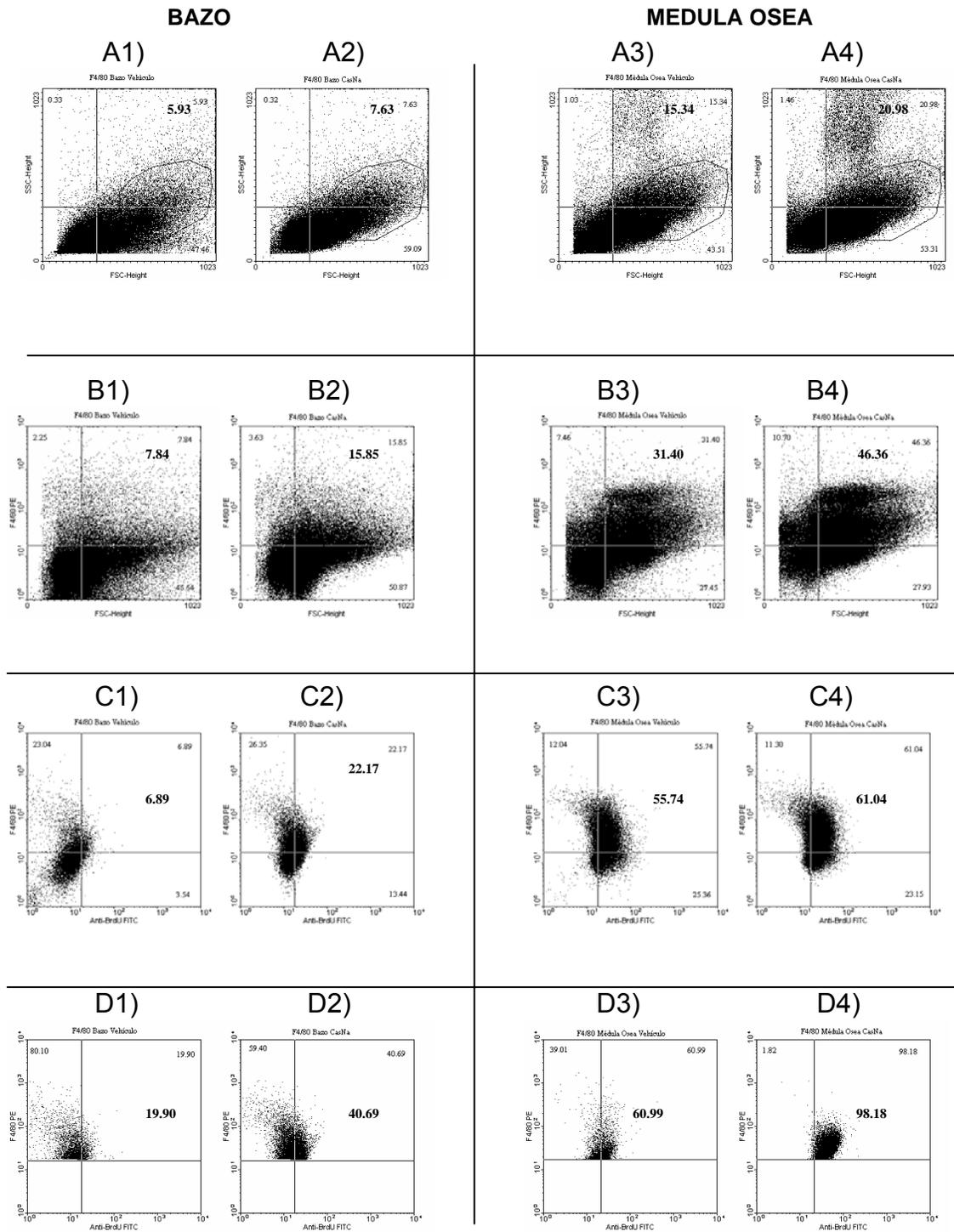


Figura 9. Células totales (A); tamaño y granularidad con la positividad para el anticuerpo anti-F4/80 (B); positividad al anticuerpo anti-F4/80 y anti-BrdU (C); porcentaje de células positivas al BrdU partiendo únicamente de la población F4/80 positiva (D).

# Macrófagos CD11b

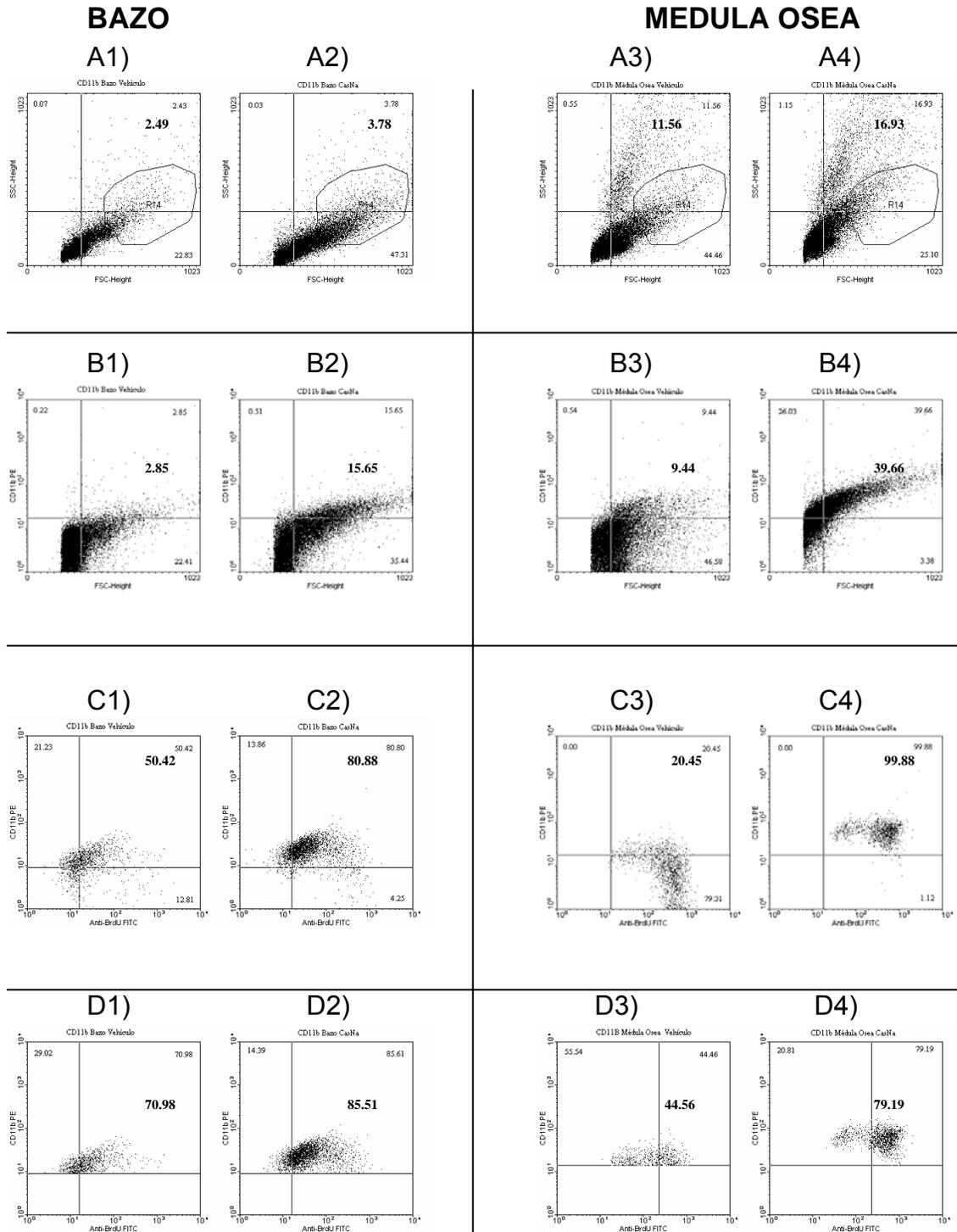


Figura 10. Células totales (A); tamaño y granularidad con la positividad para el anticuerpo anti-CD11b (B); positividad al anticuerpo anti- CD11b y anti-BrdU (C); porcentaje de células positivas al BrdU partiendo únicamente de la población CD11b positiva (D).

## Proliferación de granulocitos.

Una vez teñida la muestra con el anticuerpo anti-Ly-6G para granulocitos procedimos a analizar los resultados. De la población total de las células (Figura 11 A), comparamos tamaño y granularidad con la positividad para el anticuerpo anti-Ly-6G lo cual da idea de la posible inducción de diferenciación granulocítica (Figura 11 B). Los datos revelan que existe un incremento del 1.67 % en bazo tratados con CasNa comparados con aquellos que solo reciben vehículo (Figura 11 B1 y B2). En cuanto a la médula ósea el incremento fue del 12.09 por ciento en relación a los que solo reciben vehículo (Figura 11 B3 y B4). Detectada la inducción de diferenciación granulocítica inducida por el CasNa en la población total, procedimos a analizar la región granulocítica positiva al anti-Ly-6G y al anticuerpo/anti BrdU (Figura 11 C), nuestros resultados muestran un incremento del 13.35 % (Figura 11 C1 y C2), en bazo mientras que en médula ósea fue del 5.72 % (Figura 11 C3 y C4) en las muestras de ratones tratados con CasNa, comparados con aquellos que solo reciben vehículo. Finalmente procedimos a analizar el porcentaje de la población positiva al anticuerpo anti-Ly-6G proveniente de una división celular reciente revelado por la incorporación de BrdU. Los resultados indican que existe un incremento del 6.64 % en el bazo (Figura 11 D1 y D2) y de % en médula ósea (Figura 11 D3 y D4). Resultó interesante que en las muestras de médula ósea se observaron al menos tres subpoblaciones de granulocitos (Figura 11 C3 y C4), estas subpoblaciones fueron analizadas posteriormente y se observó que la región 2 y 3 muestran mayor proliferación de células de médula ósea de ratones tratados con CasNa comparada con las muestras de ratones que solo recibieron vehículo (Figura 11 D3 y D4).

# Granulocitos

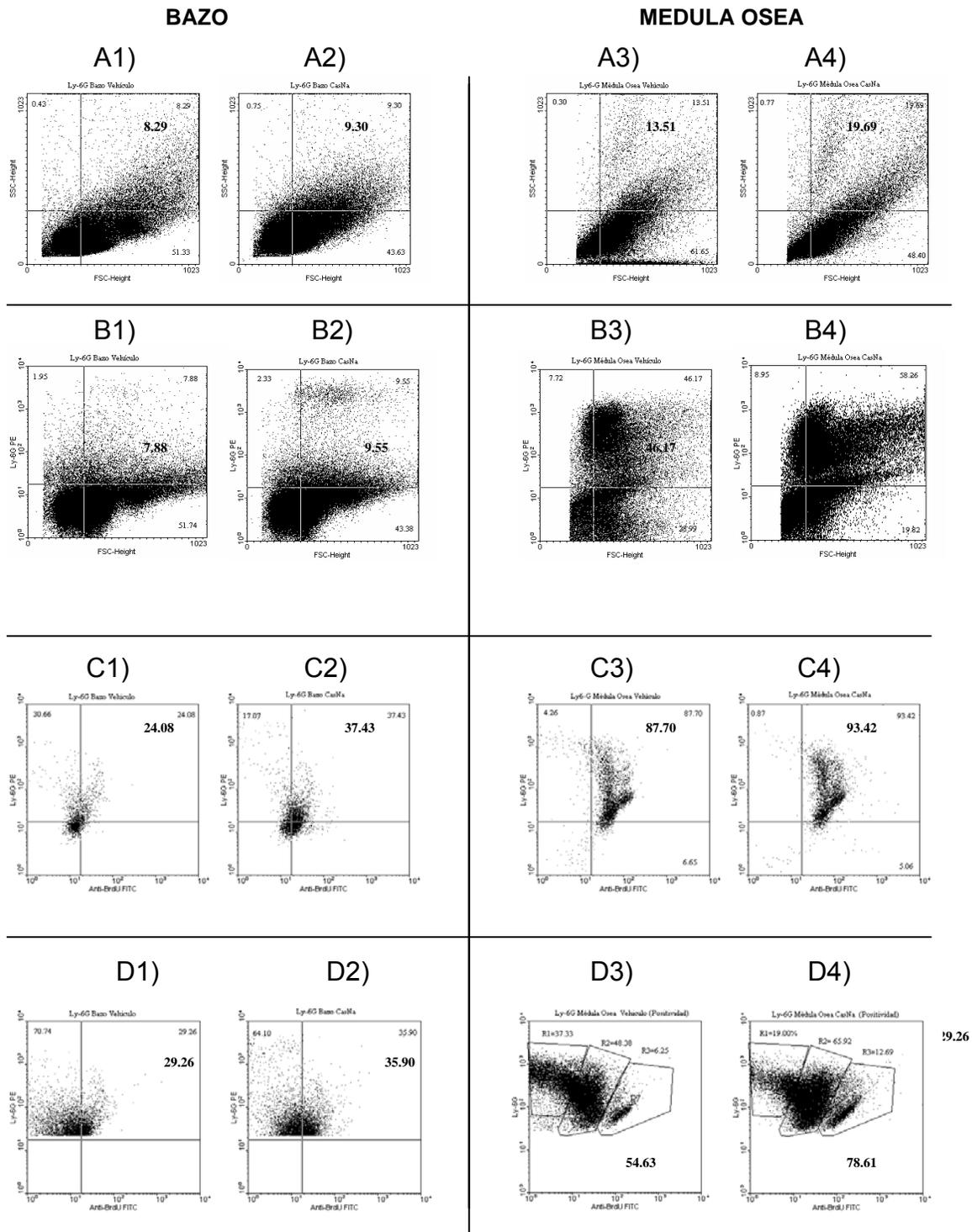


Figura 11. Células totales (A); tamaño y granularidad con la positividad para el anticuerpo anti-Ly-6G (B); positividad al anticuerpo anti-Ly-6G y anti-BrdU (C); porcentaje de células positivas al BrdU partiendo únicamente de la población Ly-6G positiva (D). Región de células en proliferación de células granulocíticas (D3 y D4)

## Proliferación de linfocitos B.

Una vez teñida la muestra con el anticuerpo anti-CD45R/B220 para linfocitos B y el anti-BrdU procedimos a analizar los resultados. De la población total de las células (Figura 12 A), comparamos tamaño y granularidad con la positividad para el anticuerpo anti-CD45R/B220 lo cual da idea de la posible inducción de diferenciación de células B (Figura 12 B). Los datos revelan que existe un incremento del 16.05 % en bazo tratados con CasNa comparados con aquellos que solo reciben vehículo (Figura 12 B1 y B2). En cuanto a las muestras de médula ósea el incremento fue de apenas 0.35 por ciento en las muestras de ratones tratados con CasNa en relación a los que solo reciben vehículo (Figura 12 B3 y B4). Detectada la inducción de diferenciación, inducida por el CasNa en la población total, procedimos a analizar solo la población en la región linfocítica positiva al anti-CD45R/B220 y al anticuerpo/anti BrdU (Figura 12 C), para detectar diferenciación acoplada a proliferación, nuestros resultados muestran un incremento del 12 % (Figura 12 C1 y C2) en bazo mientras que en médula ósea fue del 8.41 % (Figura 12 C3 y C4) en las muestras de ratones tratados con CasNa, comparados con aquellos que solo reciben vehículo. Finalmente procedimos a analizar que porcentaje de la población positiva al anticuerpo anti-CD45R/B220 provenía de una división celular reciente revelado por la incorporación de BrdU. Los resultados indican que mas de la mitad en bazo y 14.57 % mas en médula ósea positiva a anti-CD45R/B220 provienen de una reciente multiplicación celular (Figura 12 D1, D2 y D3 , D4).

# Linfocitos B

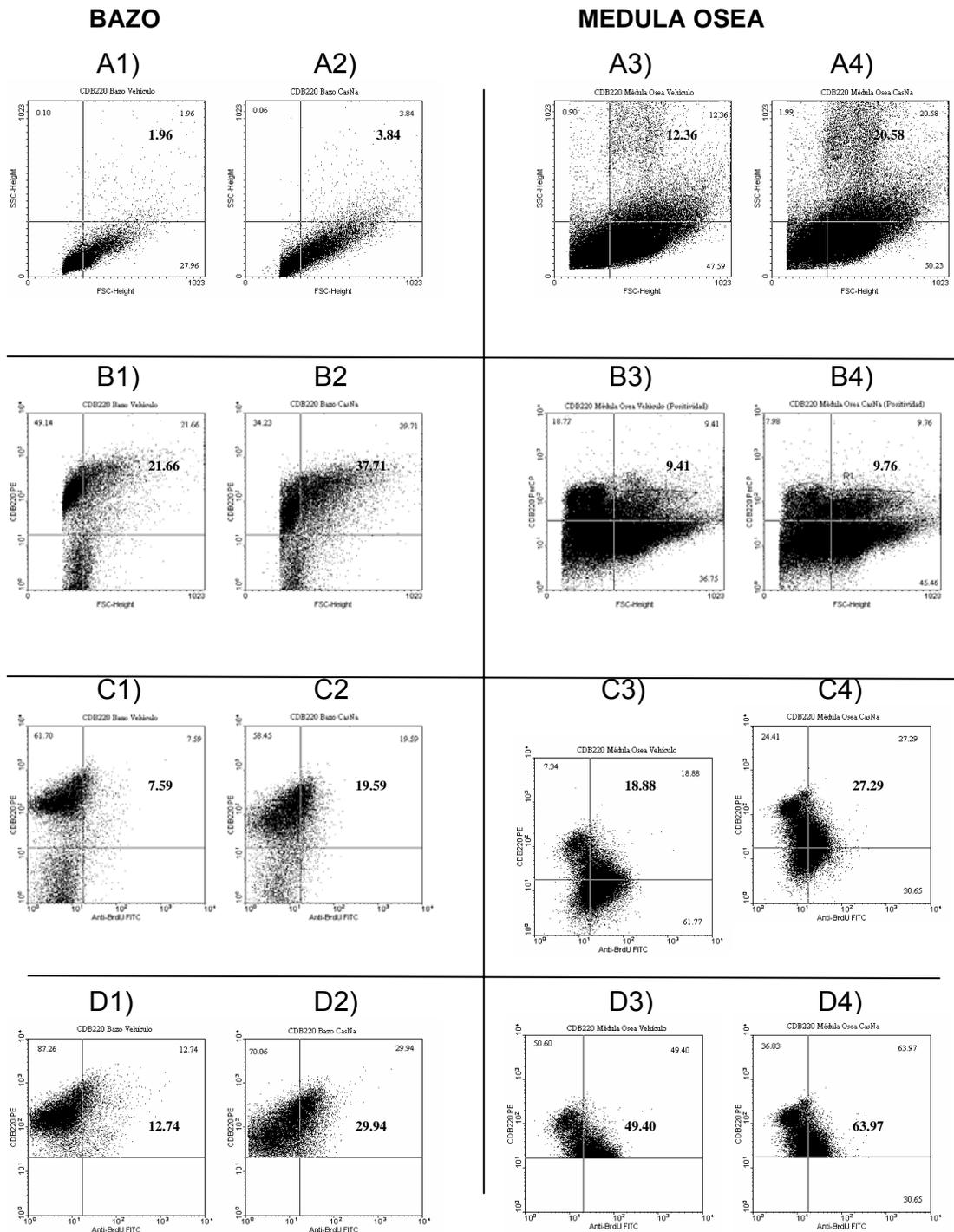


Figura 13. Células totales (A); tamaño y granularidad con la positividad para el anticuerpo anti-CD45R/B220 (B); positividad al anticuerpo anti-CD45R/B220 y anti-BrdU (C); porcentaje de células positivas al BrdU partiendo únicamente de la población CD45R/B220 positiva (D).

## Proliferación de linfocitos T.

Una vez teñida la muestra con el anticuerpo anti-CD3 para linfocitos T y el anti-BrdU procedimos a analizar los resultados. De la población total de las células (Figura 13 A), comparamos tamaño y granularidad con la positividad para el anticuerpo Anti-CD3 lo cual da idea de la posible inducción de diferenciación a linfocitos B (Figura 13 B). Los datos revelan que no existe un incremento en bazo de ratones tratados con CasNa comparados con aquellos que solo reciben vehículo (Figura 13 B1 y B2). En cuanto a las muestras de médula ósea el incremento fue del 4.55 % en las muestras de ratones tratados con CasNa en relación a los que solo reciben vehículo (Figura 13 B3 y B4). Detectada la inducción de diferenciación, inducida por el CasNa en la población total, procedimos a analizar solo la población en la región de linfocítica positiva al anti-CD3 y al anticuerpo/anti BrdU (Figura 13 C), para detectar diferenciación acoplada a proliferación, nuestros resultados muestran un incremento del 3.15 % (Figura 13 C1 y C2) en bazo mientras que en médula ósea fue del 12.27 % (Figura 13 C3 y C4) en las muestras de ratones tratados con CasNa, comparados con aquellos que solo reciben vehículo. Finalmente procedimos a analizar que porcentaje de la población positiva al anticuerpo anti-CD3 provenía de una división celular reciente revelado por la incorporación de BrdU. Los resultados indican que en bazo existió un incremento del 12.52 % y de un 5 % en médula ósea (Figura 13 D1, D2 y Figura 13 D3, D4). En cuanto a médula ósea el incremento que se observa en el Doplots es de apenas el 5 % cabe mencionar sin embargo que el número de eventos (células) analizadas por el citómetro, fue superior en las muestras de ratones que recibieron CasNa como tratamiento (18058) comparadas con el vehículo (1039) (Figura 13 D3, D4)

# Linfocitos T

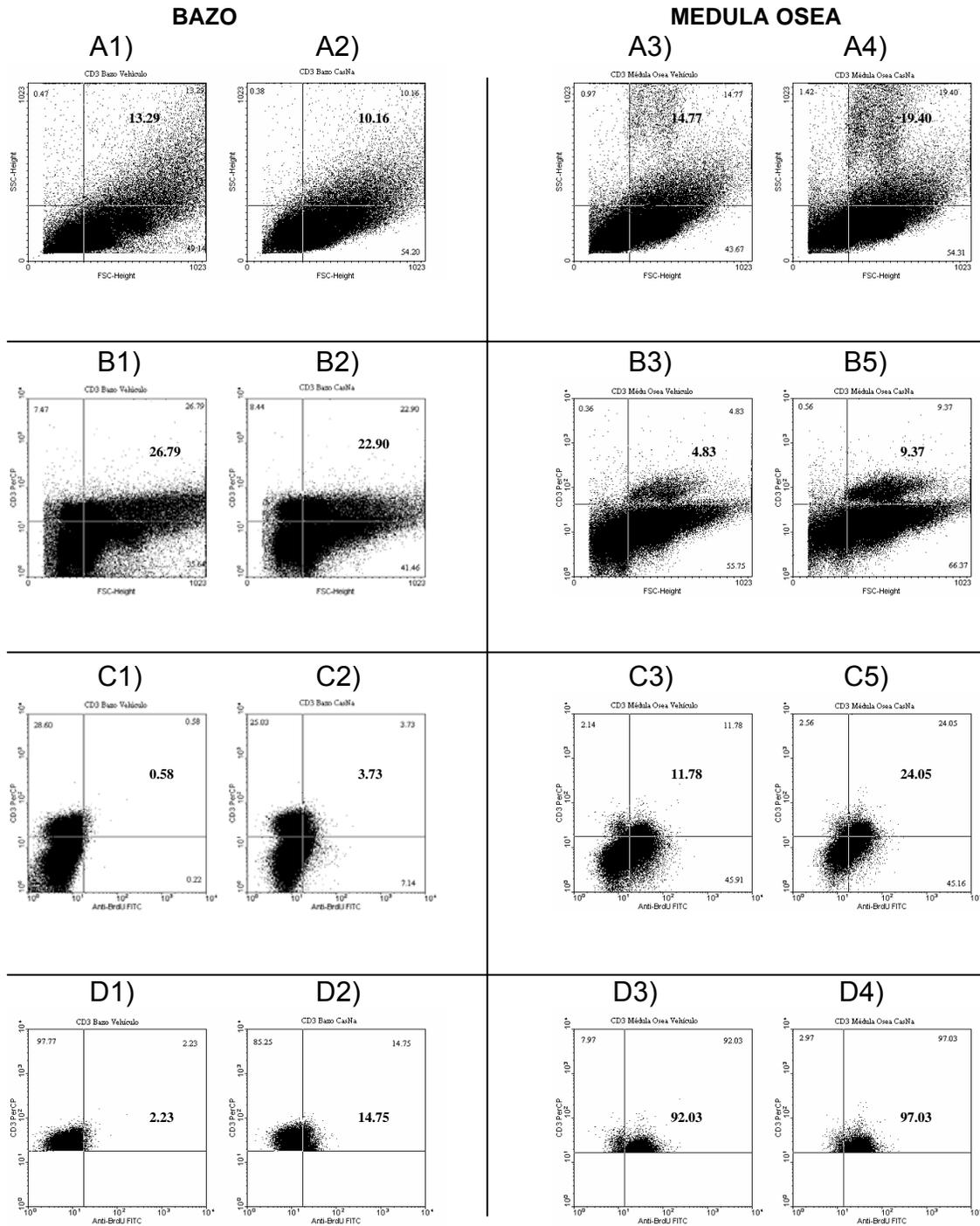


Figura 13. Células totales (A); tamaño y granularidad con la positividad para el anticuerpo anti-CD3 (B); positividad al anticuerpo anti-CD3 y anti-BrdU (C); porcentaje de células positivas al BrdU partiendo únicamente de la población CD3 positiva (D).

RESUMEN DE DATOS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACION

Tomando en cuenta solo el porcentaje de la población positiva al anticuerpo linaje específico y correlacionando la incorporación de BrdU reportamos la diferencia que existe entre las muestras de ratones que recibieron CasNa y los que solo recibieron vehículo como tratamiento tanto de Bazo como de Médula Ósea (Tabla 2).

BAZO				MEDULA OSEA		
POBLACION	VEHICULO	CasNa	DIFERENCIA PORCENTUAL ENTRE CasNa/Vehículo	VEHICULO	CasNa	DIFERENCIA PORCENTUAL ENTRE CasNa/Vehículo
GRANULOCITOS (Ly-6G)	29.26	35.90	<b>6.64</b>	54.63	78.61	<b>23.98</b>
MACROFAGOS (F4/80)	19.90	40.69	<b>20.79</b>	60.99	98.18	<b>37.19</b>
MACROFAGOS (CD11b)	70.98	85.61	<b>14.63</b>	44.46	79.19	<b>34.73</b>
LINFOCITOS T (CD3)	2.23	14.75	<b>12.52</b>	92.03	97.03	<b>5</b>
LINFOCITOS B (CDB220)	12.74	29.94	<b>17.02</b>	49.40	63.97	<b>14.57</b>

Tabla 2.-Comparación del porcentaje total de proliferación entre vehículo y CasNa . En muestras de Bazo y Médula Ósea. (Dato representativo)

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La hematopoyesis es regulada por una serie de mensajeros celulares conocidos como factores de crecimiento hematopoyéticos, miembros de la familia de las citocinas(84), aunque también existen otras biomoléculas que pueden influir en la hematopoyesis tanto *in vivo* como *in vitro*, tal es el caso de la vitamina D que tiene efectos sobre la hematopoyesis (85) o ácido retinoico, una análogo de la vitamina A, el cual regula la granulopoyésis y hoy constituye un tratamiento eficaz contra la leucemia promielocítica aguda (61,86,87), y en los últimos años se han dado evidencias de que el caseinato de sodio, una sal de la caseína, también regula la hematopoyesis *in vitro* tanto en líneas celulares (datos no publicados ) como en células normales de médula ósea (88).

Es conocido que un aumento del número de células mononucleadas en médula ósea es un parámetro que indica la activación de la hematopoyesis medular (89), mientras que el aumento en el peso, tamaño y celularidad del bazo son parámetros que indican la activación de la hematopoyesis extramedular *in vivo* (90-92). Usando estos parámetros para estudiar el potencial del CasNa para inducir la hematopoyesis medular y extramedular *in vivo*, encontramos que la inyección intraperitoneal de CasNa en ratones induce un aumento en el tamaño del bazo acompañado de un incremento en el número de células totales y mononucleadas en este órgano al igual que en la médula ósea del fémur. Estas observaciones concuerdan con datos previos en los que se muestra que la inyección del CasNa aumenta el número de mononucleadas de médula ósea después de la inyección del CasNa durante 7, 14 y 28 días, lo mismo sucede en el aumento del tamaño de los centros germinales del bazo (83). Este conjunto de datos indican que el CasNa induce la hematopoyesis medular y extramedular.

Por otro lado, la incorporación de BrdU en células de médula ósea, es un parámetro que indica proliferación celular y su uso en conjunto con anticuerpo contra antígenos mieloides y linfoides específicos revelan la inducción a la

proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas (93-94). El uso de la BromodeoxiUridina (BrdU) y anticuerpos específicos de linfocitos T, B, macrófagos y granulocitos, revela que el aumento en el número de células totales y mononucleadas en médula ósea y bazo en ratones inyectados con CasNa es consecuencia de la inducción a la proliferación hacia los 4 linajes evaluados. Bajo este contexto, nuestros datos claramente indican que el CasNa no solo induce proliferación sino que también diferenciación hacia el linaje mieloide y linfoide, por tanto consistentemente se muestra que es un regulador de la hematopoyesis medular y extramedular.

Se desconoce si las células generadas en ratones tratados con CasNa son funcionales, pero algunos datos sugieren que si. Estudios in vitro indican que el CasNa induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago en la línea celular hematopoyética de ratón 32D e inducción a la producción de anión superóxido (80), síntesis de M-CSF y TNF- $\alpha$  bioactivo (81, 96), así como acelerar la conversión de neutrófilos en banda a segmentados e inducir la producción de M-CSF bioactivo (97), así este conjunto de datos sugieren que las células generadas con CasNa son activas. Esta hipótesis tiene sentido si consideramos que la inyección IP de CasNa o caseína en ratones favorece la acumulación de granulocito-neutrófilos en las primeras horas y de macrófagos después de 24 horas de tratamiento (78), incluso que estos granulocitos tienen la capacidad de rescatar a ratones inyectados con dosis letales de bacterias (98), probablemente por la capacidad del CasNa para inducir la acumulación de factores de crecimiento hematopoyético en el suero (81).

El mecanismo de activación de la hematopoyesis in vivo e in vitro mediado por el CasNa aún no se conoce, pero el hecho de que su inyección en cavidad peritoneal en ratones incrementa la concentración de factores estimulador de colonias como el G-CSF, GM-CSF en suero y fluido peritoneal (75,77), y que el CasNa induce la producción de M-CSF y de TNF en la línea mieloide

hematopoyética multipotencial de ratón 32D (81), sugieren que tal modulación se da vía inducción a la producción de citocinas.

Aunque falta mostrar si el CasNa modula la generación de todos los linajes hematopoyéticos, la activación *in vivo* de la granulopoyesis, monopoyesis, y linfopoyesis de T y B lo ubica como una molécula con actividad similar a la mostrada por citocinas hematopoyéticas. Los factores de crecimiento hematopoyético como el G-CSF, IL-3 así como de GM-CSF se han empleado para inducir la pronta recuperación hematopoyética en individuos mielosuprimidos (110). Tomando en cuenta que el CasNa actúa como un modulador positivo de hematopoyésis, por lo menos se le puede considerar como un agente que puede inducir la recuperación de individuos mielosuprimidos, con la ventaja de que es una molécula proveniente de una fuente de alimenticia de fácil obtención y bajo costo. De hecho ya existen estudios en los que se sugiere que la caseína reduce la mielosupresión (71), y que su efecto en la eritropoyésis se debe a la modulación de la producción de eritropoyetina (74), aunque en ambos estudios la caseína es administrada como complemento dietético.

Por otro lado el hecho de que el CasNa induzca la proliferación y diferenciación *in vivo* de células involucradas en la respuesta inmune natural y específica, tiene relevancia inmunológica. Los centros germinales del bazo están constituidos por Linfocitos T, B, células asesinas naturales (NK) y células dendríticas (100-102), por ello es un sitio de reconocimiento y activación de la respuesta inmune, interesantemente el CasNa incrementa el tamaño de los centros germinales (83) y correlaciona con la inducción a la proliferación y diferenciación de células macrofágicas, granulocíticas y linfocitos T y B. Así nuestros resultados sugieren que el CasNa puede tener potencial para activar una respuesta inmune integral. En este sentido, se ha observado que una dieta baja en caseínas aumenta la incidencia de tumores de colon (104), una dieta rica en caseínas protege contra el desarrollo de cáncer intestinal en ratas (105). Además un pre-tratamiento de caseína a neutrófilos potencializa su actividad contra

tumores tales como el melanoma (106). Estos datos nos hacen pensar que el CasNa tiene un efecto inhibitor en células tumorales o líneas celulares transformadas y tal actividad probablemente se deba a la activación del sistema inmune.

Finalmente, es difícil explicar como el CasNa o la caseína inyectada por vía intraperitoneal y empleada como complemento dietético activen la hematopoyesis o modulen la respuesta inmune. Una posibilidad es que en ambos casos exista degradación de la molécula y que alguno de los péptidos liberados sea el responsable de tal modulación. De hecho ya se han reportado péptidos bioactivos de caseína con propiedades inmunomoduladoras como la b-casomorfina, un péptido obtenido después de la degradación de la b-caseína (107,108). Por otro lado, se ha reportado la existencia de receptores de caseína en granulocitos y macrófagos (109), lo cual abre la posibilidad de que las moléculas íntegras sean las responsables de la activación. Sería interesante en un futuro explorar ambas posibilidades para comprender la ruta de activación mediada por las caseínas.

## CONCLUSIONES

1.-El CasNa incrementa el numero de células totales de médula ósea y bazo.

2.- El CasNa aumenta el numero de células mononucleadas de médula ósea y bazo.

3.- El CasNa aumenta la proliferación de células granulocitos, macrófagos y linfocitos T en médula ósea.

4.- al casna aumenta el numero de granulocitos, macrófagos, linfocitos T y B en bazo.

Evidencias suficientes para decir que el CasNa es una biomolécula que tiene actividad hematopoyética in vivo.

## APENDICE

### Preparación del CasNa

El caseinato de sodio (CasNa) (SIGMA. México) se utilizó al 10% (p/v) 0.1g (100 mg.) de CasNa disuelto 1 ml (1000 µl) de agua Milli-Q previamente esterilizado en autoclave por 20 minutos a una temperatura de 120° y 15 lb de presión, al igual que el vehículo (Agua Milli-Q) se trabajo en las mismas condiciones

### Inactivación del suero fetal bovino (SFB)

El suero fetal bovino SFB (Gibco BRL, USA) congelado se coloca a temperatura ambiente para su descongelación, posteriormente se pasa a un baño de agua de 56°C durante 30 minutos, con el propósito de inactivar proteínas del complemento. Posteriormente se separan en alícuotas, para su mejor manipulación. Conservar en refrigeración a 4°C.

### 2.- Preparación de Medio Iscove's Modified Dubelcco's (IMDM).

Preparación en un litro de agua

Iscove's 17.7 g (un sobre aproximadamente)

Penicilina 0.031 g

NaHCO<sub>3</sub> 3.024 g

pH 6.9-7.0

esta solución se esteriliza por medio de una membrana (Millipore) con un diámetro de 0.22 µm. Conservar en refrigeración a 4°C.

### 3.- Preparación del colorante Azul Tripano.

Para las pruebas de viabilidad y conteo celular se empleo una dilución del colorante azul tripano (Sigma, Chem, USA) al 0.3% de PBS 1X. Antes de su uso la dilución del colorante fue filtrada haciéndose pasar a través de un filtro Whatman del numero 2. conservar a temperatura ambiente.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Ilaria Bellantuono (2004). Hematopoietic stem cells. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 36: 607-620.
- 2.-Goldman, J. M (1982). Blood and its disorders. London: Blackwell Scientific Publications.
- 3.-Reya T, Morrison S, Clarke M, Weissman I. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 414:105-111
- 4.-Klein, J (1990). Blood cells and their origin. Boston Blackwell Scientific Publications.
- 5.-Szilvassy S, Hoffman R (1995) Enriched hematopoietic stem cells: basic biology and clinical utility. Biol. Blood. Marrow Transpl. 1:1-17.
- 6.-Mayani H.(2003) A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts and clinical relevance. Arch. Med. Res. 34:3-15.
- 7.-Kamel-Reid S, Dick J (1999) Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cell. Science. 242: 1706-1709.
- 8.-Morrison, S. J. and Weissman I.L (1994) The long term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunol. 1: 661-673.
- 9.-Morrison, S.J; Wandycz, A. M; Hemmati H.D;Wright, D. E and Weissman, I.L (1997) Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. Development. 124: 1929-1939.

10.-Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman I (2003). Normal and leukemic hematopoiesis are leukemias a stem cells disorder or a reversion of stem cell characteristics? PNAS. 30: 1182.

11.-Morrison SJ, Wanders AM, Herrmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. Development (1997). 124: 1929.

12.-Adolfson, J Borge, O. J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I and Sitnicka, E., et al., (2001) Up regulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-) Sca(-) c-Kit(-). stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. Immunol. 15:659-669.

13.-Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T and Weissman I.L (2000a) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature. 404: 193-197.

14.-Hao, Q.L., Zhu, J., Price M. A., Payne, K. J., Barsky, L. W and Crooks, G. M (2001) Identification of a novel human multilineage progenitor in cord blood. Blood. 97; 3683-3690.

15.-Manz M, G., Miyamoto, T Akashi, K and Weissman I.L (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. PNAS. 99 11872-11877.

16.-Akashi K, Reyna T, Dalma-Weishausz D, Weissman I. (2000b) Lymphoid precursors. Current Opin. Immunol. 12: 144-154.

17 Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell, 28: 661.

- 18.- Brecher, G; Beal, S.L & Schneiderman, M (1986). Renewal and release of hematopoietic stem cells: does clonal succession exist?. *Bloods Cells*. (12): 103-127.
- 19.- Larsson & Karlsson S. (2005). The role of smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*. 24: 5676.
- 20.-Bondurant M, Koury M. (1999). Origin and development of blood cells. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editors. *Wintrob's Clinical Hematology*. 10<sup>a</sup>. Ed. Lippincott Williams & Wilkins USA:145-168.
- 21.- Williams J.W, Beutler E, Erslev A. J, Rundles W.R. (1978) *Hematología*. Ed. Salvat. 2<sup>a</sup> edición T.I España.; 61pp.
- 22.-Allen T.D, Dexter T.M, Simons P.J, Marrow biology and stem cell. In Dexter T.M, Garland J.M, Testa N.G.(ed) . (1990): *Colony stimulating factors: Molecular and cellular biology* Marcel Dekker. New York. 1 pp.
- 23.-Peterse D. (1996) Extended long term culture reveals a highly quiescent and primitive human haematopoietic progenitor population . *Blood*.; 88:3306-3313.
- 24.-Dorshkind K. (1990) Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products *Annu Rev Immunol*, 8: 111.
- 25.- Tong Yin & Linheng Li. (2006). The stem cells niches in bone. *Journal Clin. Invest*. (116):1195-1201.
- 26.- Medvinsky, A & Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* (86): 897-906.

- 27.- Gordon, S Raser I, Nath D, Huges, D& Clarke, S. (1992). Macrophages in tissues and in vitro. *Current Opinion in Immunology*. (4): 25-32
- 28.- Naito, M; Umeda, S; Yamamoto, T; Morillama H; Umezu, H & Hasegawa G *et al.* (1996). Development, differentiation, and phenotypic heterogeity of murine tissue macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. (59): 133-138.
- 29.- Xu M.J; Matsuoka, S; Yang, F.C; Ebihara, Y; Manabe, A & Tanaka, R. (2001). Evidence for the presence of murine primitive megacaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood* (97): 2016-2022.
- 30.- Yoder, M. C; Haitt, K; Dutt, P; Mukherjee, P; Bodine, D. M; & Orlic, D. (1997). Characterization of definitive lymphohemtopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity*. (7): 335-344.
- 31.- Godin, Garcia-Porrero, J. A; Dieterlen-Lievre, F & Cumano A. (1999). Stem cell emergenc and hem,atopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *Journal of Experimental Medicine*. (190): 43-52.
- 32.- Huang, H & Auerbach, R. (1993). Identification and characterization of hematopietic stem cell from the yolk sac of early mouse embryo. *Procedings of the national Academy of Sciences of United States of America*. 90 (21); 10110-10114.
- 33.- Muller, A. M; Medvinzky A; Strouboulis, J; Grosveld F & Dzierzak, E. (1994) development of haematopietic stem cell activity in the maose embryo. *Immunity*. (1):291-301.
- 34.- Delassus, S & Cumano, A. (1996). Circulation of hematopietic progenitors in mouse embryo. *Immunity*. (4): 97-106.

- 35.- Murray, P.D.F. (1932). Development in vitro of blood of the early chick embryo. Proceedings of the Royal Society London. (111): 497-521.
- 36.- Robb, L; Elefanty, A.G.(1998). The hemangioblast an elusive cell captured in culture. Bioessays. (20) 611-614.
- 37.- Robertson, S; Kennedy, M & Keller, G. (1999). Haematopoietic commitment during embryogenesis. Annals of the New York Academy of Science. (872): 9-15.
- 38.- Shalaby, F; Ho, Stanford, W.L; Fischer, K, D; Schuh, A. A & Schuartz, L. *et al.* (1997). A requirement for Flk-1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. Cell. (89) 981-990.
- 39.- Pluznick D, Sachs L (1965). the cloning of normal mast cells in the tissue culture J. Cell. Comp. Physiol, 66: 319.
40. Dorskind K.(1990). Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. Annu Immunol. 8: 111-115.
- 41.-Begg SK, Radley JM, Pollard JW, Stanley ER, Crisholm OT, Bertencello I. (1993). Delayed hemtopoietic development in osteopetrotic (OP-OP) mice. J. Exp. Med. 177: 237-240.
- 42.-Gordon M, Barret M. (1985). Bone marrow disorders, the biological basis of clinical problems chapter 2; hematopoietic precursors cells. Blackwell. Sci. publ. London. England. Pp20-59.
- 43.- Nilson SK, Bertencello I. (1994) Age related with changes in extramedullary hematopoyésis in the spleen of normal and perturbed osteopetrotic (op/op) mice. Exp Hematol. 22:377.

44.-Garcia CJ, Sierra J. (2003). Hematologia 1a Edicion España. Ediciones Aran. Pp39-46.

45.-Miales JB (1985). Hematologia medica de laboratorio. España. Editorial. Revelte. Pp 115-123.

46.-langman J. (1986). Embriología medica. 5ta Edicion. Mexico. Editorial. Medica Panamericana. pp 350-351.

47.-Weiss I (1963). The structure of intermediate vascular pathways in teh splen of rabbits. Am. J. anat. 113: 51-55.

48.-Dennis P O`Malley et al. (2005). Morphologic and immuni histochemical evaluation of splenic hematipoietic proliferations in neoplastic and bening disorders. Modern Pathology. 1-12.

49.-Snover DC, Frizzera G, Spector BD et al. (1981). Wiskott-Aldrich syndrome: histopatologic findings in the lymph nodes and spleen of 15 patients. Hum. Pathol. 12:821-831.

50.-Freedman MH, Saunders EF. (1981). Hematopoiesis in the human spleen. Am. Jurnal. Haematol. 11:281-275.

51.-O`Keane JC, Wolf BC, Neiman RS. (1989). The pathogenesis of splenic extramedullary hematopoiesis in metastasic carcinoma. Cancer 63: 1539-1543.

52.-Arnold R, Calvo W, Heymer B et al. (1985). Extramdullary hematopoiesis after bone marrow transplantation. Scan. J. Haematol. 34: 9-12.

53.-Hassan NM, Neiman RS. (1985). The pathology of the spleen in steroid-treated immune thrombocytopenic purpura. Am. J. clin. Pathol. 11:433-438.

- 54.- Douay L, Laporte JP, Lefrancois G et al. (1987). Blood and spleen haematopoiesis in patients with myelofibrosis. *Leukaemia Research*. 11:725-730.
- 55.-Wolf BC, Banks PM, Mann RB et al. (1988). Splenic hematopoiesis in polycitemia vera. *Am. J. clin. Pathol*. 89: 69-75.
- 56.- Dilly SA, Sloane JP. (1988). Cellular composition of the spleen after human allogenic bone marrow transplantation. *J. Pathol*. 155: 151-60.
- 57.-Mathew A, Raviglione MC, Niranjana U. et al. (1989). Splenectomy in patients with AIDS. *Am. J. Hematol*. 32: 184-189.
- 58.-Horny H-P, Ruck M, Kaiserling E. (1990). Immunohistology of human spleen after bone marrow transplantation for leukaemia with special reference to early post-transplantation period. *Pathol. Res. Pract*. 186: 775-783.
- 59.-Saracco SM, Farhi DC. (1990). Splenic pathology in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Surg. Pathol*. 14: 223-229.
- 60.-Chang CS, Li CY, Cha SS. (1993). Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Splenic pathologic features and their clinical correlation. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 117:-981-985.
- 61.- David G Madoff .et al (2005). Splenic arterial interventions: anatomy indications technical, considerations and potential considerations. *Radiographics*. (25): S191-S211
- 62.-Metcalf D. (1998). Cell-Cell signalling in the regulation of blood cell formation and function. *Inmunol Cell Biol*. 76: 441-447.

63.- Aguirre de Avalos M.V, Quintana R, Brandon N. (2002). Citoquinas. Catedra de bioquimica. Facultad de medicina U.N.N.E.

64.-Daniel R. Barreda et al. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 509-554.

65.- Quesenberry P, Levitt I. (1979). Hematopoietic stem cells. *N. Engl. Med.* 301: 755-761.

66.- Matsui T. J, H. Pierce, T.P. Fleming, J.S. Greenberger, W. J Larochelle, M. Ruggiero and S. A Aaronson. (1989). Independent expression of human a or b platelet-derived growth factor receptor cDNA in a naïve hematopoietic cells leads to functional coupling with mitogenic and chemotacti signalling pathways. *PNAS*. 86:8314-8318.

67.-Pierce J.H, M. Ruggiero, T.P Fleming, P.P Difiore, J.S Greenberger, L. Varticovski, J. Schlessinger, G. Rovera and S.A. Aaronson. (1988). Signal transduction trough the EGF receptor transfected in IL-3 dependent hematopoietic cells. *Science*. 239: 628-631.

68.-Rohrschneider L. R and Metcalf D. (1989). Induction of macrophage colony-stimulating factor-depend growth and differentiation after introduction of murine c-mfs gene in to FDC-P1 cells. *Mol. Cell. Boil.* 9: 5081-5092.

69.-Sherr C. J, C. W Rettenmier, R Sacca, M. F. Roussel, A. T. Look and E. R. Stanley. (1985). The c-mfs proto-oncogen product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell*. 41: 665-676.

70.- Halleck M. (1995). Tyrosine Kinases and phosphatases in hematopoietic growth factor signalling. In Mertels R and Herrman F. Hematopoietic growth in clinical applications. Second Edition. Marcel Dekker New York pp19.

71.-Sawyers C. (1999). The hematopoietic-lymphoid neoplasms: molecular genetics of acute leukaemia en: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Grees J, G, Editores. Wintrob's Clinical Hematology. 10ma ed. Lippincott Williams and Wilkins USA. pp:1998-2008.

72.-Wickremasinghe R, Hoffbrand V. (2000). Molecular basis of leukaemia and lymphoma. En : Provan D, Gribben J. editors. Molecular haematology. Blackwell Science. Great Britain. pp:25-41.

73.-Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. (2002). Cyclin D-dependent kinases. INK4 inhibitors and cancer. Biochem. Biophys. Acta. 1602:73-87.

74.-Manuel R. Morales-Polanco, Hector Mayani, Mario Gutierrez-Romero, Eucario Leon-Rodriguez(2004). Síndromes Mielodisplásicos. Hematología actualización de la AMEH. pp 78.

75.-Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. (1976). Proposals of the classification of acute leukemias. Br. J. Haematol. 33:451.

76.- Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukaemia: a report for the French American-British cooperative group. Ann. Intern. Med. 103:626.

77.-Jose Gonzalez-Llaven, Eduardo Terreros-Muñoz, Luis A. Meillon-Garcia, Manuel . Castillo-Rivera, Enrique Baez-de la Fuente, Pedro Sobrerilla-Calvo (2004). Leucemia Mieloblastica Aguda. Hematología actualización de la AMEH. pp 97-106.

78.-Amit N, Andrew D, David L (2004). A review of gene therapy for hematological disorders. *British journal of haematology*. 128: 3-17.

79.- Richard MS, Margaret RO, Mikkael AS. (2004) Akute myeloid leukemias. *Hematology* , pag 98-117.

80.-Ernesta Parisi (2002). Acute Myelogenous leukemis: advances and limitations of tratament. *Oral medicine*. 93:257-263.

81.-David SZ, Luciano DP, Keith DW, Glenn MM (2005). Advances in childhood leukaemia: succesful clinical trails research to individualised therapy. *MJA* 182: 78-81.

82.-Metcalf D (1989). The molecular control of cell division , differentiation commitment and maturation in hematopoietic cells. *Nature (longdon)*. 339: 27-300.

83.-, B. Migliaccio, G., A. R Migliaccio L, Kreider, G Rovera and J.W Adamson. (1989). Selection of lineage-restricted cells lines ammortalized at different stages of hematopoietic differentiation from the murine cell line 32D. *J. Cell. Boil*. 109:833-841.

84.-Nicola, N. A (1989). Hematopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu. Rev. Biochem*. 58:45-77.

85.- Nadezda, Cherdintseva et al. (2005). Effect of tocopherol-monoglucoside (TMG), a water-soluble glycosylated deriviate of vitamin E, on hematopoietic recovery in irradiated mice. *J. Radiat Reserch*. 46(1):37-41.

86.-Kuwata T, Wang I, Tamura T, Ponnampereuma R, Levine R, Holmes K, Morse III H, De Luca L, Ozato K. (2000). Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood*. 95: 3349-55.

87.-Aschkenasy A. (1971). Effets comparés de la caséine et de divers melanges amino-acides sur la restauration de l'érythropoïèse, de la neutropoïèse et de la lymphopoïèse chez des rats préparés par une privation prolongée de protéines. Nouvelles études. Arch Sci Physiol. 25:415-30.

88.-Dawson M, Elstner E, Kizaki M, Chen D, Pakkala S, Kerner B, and Koeffler P. (1994). Myeloid differentiation mediated through retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RXR) not RXR/RXR pathway. Blood. 84: 446-452.

89.-Stanović S, Boranić M. (1996). Neuropeptides, endogenous opioid peptides and cell proliferation. Lijec Vjesn. 121: 82-87.

90.-Walstra P and Jenneis R.(1984). Dairy chemistry and physics. John Wiley Sons, New York.

91.- Okano M, Ohnota H, Sasaki R. (1992). Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. J Nutr. 122: 1376-83.

92.- Lotem J, and Sachs L. (1985). Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation. Int J Cancer. 35: 93-100.

93.- Passoti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G. The effect of opioid peptides of peripheral blood granulocytes. Riv Eur Med Farmacol 1993, 2:71.

94.- Metcalf D, Robb L, Dunn A, Mifsud S, Rago L. (1996). Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of acute neutrophil inflammatory response in mice. Blood. 88: 3755-3764.

- 95.- Noursadeghi M, Bickerstaff M, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys M. (2002). Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J Immunol.* 169: 913-19.
- 96.- Bautista M. (1998). Efecto de factores activadores y diferenciadores sobre el granulocito-neutrófilo en banda: Diferenciación, fragmentación del ADN y producción de M-CSF. Tesis Licenciatura, FES Zaragoza, UNAM.
- 97.-Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. (2000). El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Invest Clin*, 52: 638-644.
- 98.-Gerardo Ramos, Benny Weiss, Yolanda Cordova, Jorge Hernández, Isaac Zambrano and Edelmiro Santiago. (2004). Sodium caseinate induces expresión and secretion of murine multipotent myeloid cell line 32D macrophage colony-stimulating factor. *Archives of medical research.* 35:109-113.
- 99.- Ramos G (2004). efecto de caseinas y casomorfinas en la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mieloides 32D y WEHI-3. Tesis doctoral octubre FES.UNAM.
- 100.- Lagunez S.H.E.(2004) estimulación de la hematopoyesis medular y extramedular inducida por el caseinato de sodio (CasNa) en ratones BALB/c. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM.
- 101.-Ciudad A, Cid J, Velasco A, Lara JM, Orfao A. (2002). Flow cytometry measurement of the DNA conts of GO/G1 diploid cells from different Teleost fish species. *Cytometry.* 48 (1); 20-5.

102.-Martin Stacey, Gin-Wen Chang *et al.* (2002). EMR4 a novel epidermal growth factor (EGF)-T M7 molecule up-regulated in activated mouse macrophage, binds to a putative cellular ligand on B lymphoma cell line A20\*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (32); 29283-29293.

103.-Antonio M, Giovanni R. (1995). Leucocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Histological*. (80) 161-175.

104.-Sanjai Magendra and Annette J Schlueter. (2004). Absence of cross-reactivity between murine Ly-6C and Ly-6G. *Cytometry*. 58A; 195-200

105.-Barishnikov Alu, Poloshkina ER. (2001). CD3 monoclonal antibodies immunology. *Vet. Ross. Akad. Med.* (9); 14-8.

106.-Amy Reiclin Ana Gazumy *et al.* (2007). A B cell receptor with two Ig alpha cytoplasmic domains support development of mature but anergic B cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 199(4);855-865.

107.-Belosevic M, Barreda DR, et al (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol*. May 3;28(5):509-54. Review.

108- Urahama N, Ito M, Sada A, Yakushijin K, Yakamoto K, Okamura A, Minagawa K, Hato A, Chihara K, Roeder RG, Matsui T.(2005) .The role of transcriptional coactivator TRAP220 in myelomonocytic differentiation. *Genes Cells*. Dec;10(12):1127-37.

109.-Dawson. (2003) Regulation of retinoic acid receptor beta expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in cancer cells. *Cancer Res*. Jul 1;63(13):3531-8.

- 110.-Fenaux P, Chomienne C, Degos L. (2001). All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol.* 38: 13-25.
- 111.- Martinez V. N. (2006). Estudio de la proliferación "in vivo" de células hematopoyéticas de médula ósea en ratones inyectados con caseinato de sodio (CasNa). Teis de licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM.
- 112.- Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Sehgal PA, Nathan DG, Clark SC. (1986). Stimulation of hematopoyésis in primates by continuous infusion of recombinant human GM.SCF. *Nature* 321:872.
- 113.- Takeshi K , Wang IM, Tamura T, Ponnampereuma RM, Levine Rachel, Holmes KL, Herbert C, Morse III, De luca LM, Ozako K. (2003). Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood.* 95: 3349.
- 114.- Begg SK, Radley JM, Pollard JW, Stanley ER, Crisholm OT Bertoncello I. (1993) Delayed hematopoietic development in osteopetrotic (OP/OP) mice. *J Exp Med.* 177: 237.
- 115.- Langevort (1963). The histopatology of the antibody response. I. Histogenesis of the plasma cell reaction rabbit spleen. *Lab. Invest.* 12:106.
- 116.-Lizhen Pang, Prem Veer Reddy, Christina I, Mcauliffe, Gerald Colvin, Peter J. Quesebbarry. (2003). Studies on BrdU labeling of hematopoietic cells: stem cells and cell lines. *Jornal. of cellular Physiology.* 197: 251-260.
- 117.-Joyce B. Reome, Darris S Johnston, Brian K. Helmich, Tammy M. Morgan, Nicholas Dutton-Swain and Richard W. Dutton. (2000). The effects of prolonged administration of 5-Bromodeoxyuridine on cells of the immune system. *The Journal of Immunology.* 165; 4226-4230.

118.- Carsseti R, Rosado MM, Wardmand H. (2004) Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* Feb;197:179-91.

119.-Ledesma E. (2005). El caseinato de sodio (CasNa) induce la producción de TNF-alfa en la linea celular 32D de ratón. Tesis de Maestria. FES-Zaragoza. UNAM.

120.- Santiago E, Mora L, Montesinos J, Ventura J, Machuca C, Mendoza J. (1994). Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblast. *Rev. inv. Clin. (suppl).* 1:253.

121.-Passoti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G.(1993) Ther efect of opioid peptides of peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Med Farmacol,* 2:71.

122.- Weiss L (1972). The spleen, in the cells and tissues of the immune system, estructura, functions, interactions. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 1972 pp 49.

123.-Fujii S, Hamada H, Fujimoto K, Shimomura T, Kawawita M. (1999) Activated dendritic cells from bone marrow cells of mice receiving cytokineexpressing tumor cells associated with the enhanced survival if mice bearing syngenic tumors. *Blood.* 93: 4328.

124.-Chaplin DD. (2002). Regulation of spleen withe pulp structure and function by lymphotoxin. *Adv. Exp. Med. Boil.* 512:49.

125.-Ruddle NH (2006)Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol.* ;7(4):344-53.

126.-Tatsuta. (1992). Enhanced induction of colon caracinogenesis by azoxymethane in wistar rats fed a low protein diet. *Int j. cancer.* 50:108.

127.-McIntosh G. H, Regester G. O, Leu L.R.K, Rogle P. J , Smither G. W. (1995). Dairy protein protect againd dimethylhidrazyne induced intestinal cancer in rats. J. Nutr. 125: 809-816.

128.- Chen IL, Chen SH, Wuang JY, Yang BC. (2003)Fas ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils. J Immunol. 1;171(3):1183-91.

129.- Elitsur Y. Luk G. (1991). Beta-casomorphin (BCM) and human colonia lamina propia lymphocyte proliferation. Clin. Exp. Immunol. 85: 493-497.

130.-Kayser H and Meisel H.(1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. FEBS Lett. Mar 25;383(1-2):18-20.

131.- Lewis S, Van Epss D, (1983). Demostration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. Inflammation. 7:363-375.