



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CAMPO DE CONOCIMIENTO

ESTUDIO DEL EFECTO DEL CASEINATO DE SODIO (CasNa)
SOBRE LA LINFOPOYESIS EN RATONES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

QFB ADRIÁN SOLÍS GONZÁLEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
FES-ZARAGOZA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
FES-ZARAGOZA, UNAM
DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CAMPO DE CONOCIMIENTO

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL CASEINATO DE SODIO (CasNa)
SOBRE LA LINFOPOYESIS EN RATONES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

QFB ADRIÁN SOLÍS GONZÁLEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
FES-ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
FES-ZARAGOZA, UNAM
DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2013

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de abril de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS (Biología Experimental)** del (la) alumno (a) **SOLÍS GONZÁLEZ ADRIÁN** con número de cuenta **098556281** con la tesis titulada **“ESTUDIO DEL EFECTO DE CASEINATO DE SODIO (CasNa) SOBRE LINFOPOYESIS EN RATONES”**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**:

Presidente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Secretario: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
Emergente DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de julio de 2013.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM

Al Proyecto de Investigación PAPITT IN-225610 y el FONDO SEP-CONACyT 104025

A los respetables miembros de mi comité tutorial

A mi Tutor el DR EDELMIRO SANTIAGO

A mis cotutores:

DRA MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

Un agradecimiento especial al DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

Por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

- **A DIOS POR PONERME EN ESTE CAMINO**
- **A MI FAMILIA QUE SIEMPRE ME HA APOYADO**
- **A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO, SIN QUIENES NO HABRIA SIDO POSIBLE DESARROLLAR ESTE TRABAJO**
- **A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO Y EN ESPECIAL A LOS DIRECTIVOS POR LAS FACILIDADES OTORGADAS**

DEDICATORIA

**ESTE TRABAJO SE LO DEDICO EN ESPECIAL A UNA PERSONA
QUIEN DECIDIO COLABORAR CON MIGO EN EL PROYECTO MAS
IMPORTANTE DE NUESTRAS VIDAS**

“A MI ESPOSA”

GRACIAS MARTHA

INDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	8
• LA SANGRE	8
• HEMATOPOYESIS	15
• ONTOGENIA	15
• MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO	17
• CITOCINAS	23
• PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN	30
• TRANSTORNOS HEMATOLOGICOS	40
• TRATAMIENTO CONTRA NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOLÓGICAS	42
• DERIVADOS DE LA LECHE Y LA SANGRE	47
• CASEINAS Y HEMATOPOYESIS	48
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	51
HIPOTESIS	51
OBJETIVOS	52
MATERIAL Y MÉTODO	53
RESULTADOS	61
ANÁLISIS DE RESULTADOS	75
CONCLUSIONES	80
PRESPECTIVAS	80
BIBLIOGRAFIA	81

ABREVIATURAS

AGM	Zona aorta-gónada-mesonefros.
ATRA	Ácido Transretinoico, del inglés <i>All –Trans Retinoic Acid</i> .
BFU-e,	Unidades formadoras de brote eritroide, del inglés <i>Burst Forming Unit erytroid</i> .
BFS	Suero fetal bovino, del inglés <i>Bovine Fetal Serum</i> .
BrdU	Bromodeoxiuridina.
CasNa	Caseinato de sódio.
CMN	Células mononucleadas.
CLP <i>Progenitor.</i>	Progenitor linfoide común, del inglés <i>Commun Lymphoid Progenitor</i> .
CMP <i>Progenitor .</i>	Progenitor mieloide común, del inglés <i>Commun Myeloid Progenitor</i> .
CFU-GEMM	Unidad formadora de colonias mixta de granulocitos, eritrocitos monocitos y megacariocitos, del inglés <i>Colony Froming Unit Granulocytic, Erytroid, Monocyte and Megakaryocyte</i> .
CFU-MkE,	Unidad formadora de colonias megacariocitas y eritroides del inglés <i>Colony Forming Unit-Megakaryocytes and Erytroid</i> .
CFU-GM	Unidad formadoras de colonias granulocito-macrófago, del inglés <i>Colony Forming Unit Granulocytes and Macrophages</i> .
Células NK	Células asesinas naturales.
CFU	Unidad formadora de colonias, del inglés <i>Colony Forming Unit</i> .
ELP <i>Progenitor.</i>	Progenitor linfoide temprano, del inglés <i>Early Lymphoid Progenitor</i> .
EPO	Eritropoyetina.
FITC <i>Isotiocianate.</i>	Isotiocianato de fluoresceína, del inglés <i>Fluoresceine Isotiocianate</i> .
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos, del inglés <i>Granulocyte Colony Stimulating Factors</i> .
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés <i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i> .

HSC <i>Cell.</i>	Célula troncal hematopoyética, del inglés <i>Hematopoietic Stem</i>
IL	Interleucina, del inglés <i>Interleukin</i> .
IL-7R α	Receptor de la interleucina 7, del inglés <i>interleukin 7 alpha Receptor</i> .
IP	Intraperitoneal.
IFN- γ	Interferón gamma.
JAK	Tirosina janus cinasa, del inglés <i>Janus kinase tyrosine</i> .
LB	Linfocito B.
LDP	Linfocito doble positivo.
LIF <i>Factor.</i>	Factor inhibidor de leucemia, del inglés <i>Leukemia Inhibitor</i>
LMPP	Progenitor multipotencial predispuesto al linaje linfoide, del inglés <i>Lymphoid Multipotent Primed Progenitor</i> .
LSP	Linfocito unipositivo; LT.
LT-HSC	Célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo, del inglés <i>Long Term Hematopoietic Stem Cell</i> .
LT	Linfocito T.
ST-HSC	Célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo, del inglés <i>Short Term Hematopoietic Stem Cell</i> .
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos, del inglés <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> .
M-CSFR	Receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos, del inglés <i>Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor</i> .
MPP	Progenitor multipotencial, del inglés <i>Multi-Potent Progenitor</i> .
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa, del inglés <i>Macrophage Inflammatory Protein</i> .
NK	Célula asesina natural, del inglés <i>Natural Killer</i> .
PBS	Solución estabilizadora de fosfatos.
Pre-NK,	Precursor de NK.
Pre-pro B	Precursor de células pro B.

Pro-Btm	Célula pro B temprana.
Pro Btr	Célula pro B tardío.
Pre-B	Célula pre B.
Pre-pro T	Célula precursora pro T.
Pro T	Célula pro T.
CSF	Factor estimulador de células troncales, del inglés <i>Stem Cell Factor</i> .
STAT	Transductores de señal y activadores de la transcripción, del inglés <i>Signal Transducer Activator Transcription</i> .
TCR	Receptor de células T, del inglés <i>T Cell Receptor</i> .
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> .
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta, del inglés <i>Tumor Growth Factor beta</i> .
TPO	Trombopoyetina.

RESUMEN

La hematopoyesis es un proceso complejo por el cual todos los linajes celulares que componen la sangre son generados a partir de células troncales hematopoyéticas, las cuales se localizan dentro de la médula ósea, donde proliferan y se diferencian hacia células precursoras, tanto de estirpe mieloide como linfoide. La proliferación y diferenciación de las células progenitoras se lleva a cabo dentro del microambiente hematopoyético, el cual está constituido por diversas moléculas de adhesión y citocinas, siendo estas últimas las principales responsables de diferenciación hacia el linaje mieloide o linfoide. Posteriormente las células diferenciadas son liberadas a la circulación sanguínea, hacia órganos periféricos para posteriores procesos de maduración y/o llevar a cabo su función biológica.

Dentro de las terapéuticas actualmente empleadas para el tratamiento de enfermedades que requieren activación de la hematopoyesis, se encuentran; el uso de factores de crecimiento hematopoyético, como el G-CSF, GM-CSF y EPO; el uso de biomoléculas, con capacidad de modular la hematopoyesis, como el ácido trans-retinoico (ATRA). En modelos murinos actualmente se prueba con moléculas pro-inflamatorias para inducir la granulopoyesis y linfopoyesis B extramedular, pero inhiben la linfopoyesis T.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado *in vivo*, que el CasNa, un agente proinflamatorio, moviliza granulocitos y macrófagos, induce incremento en la concentración en suero y exudado peritoneal de M-CSF, G-CSF y GM-CSF, además de permitir la sobrevivencia de ratones inoculados con dosis letales de bacterias. Sin embargo no se ha analizado si el CasNa, como molécula proinflamatoria, modula la linfopoyesis *in vivo*.

En nuestros ensayos *in vivo* demostramos que el CasNa induce inflamación aguda sin llegar a desencadenar inflamación crónica, es un potente quimioatrayente, incrementa la respuesta de los fagocitos en cavidad peritoneal,

induce la linfopoyesis B en bazo así como la linfopoyesis T, dato contrario a lo observado con otros agentes pro-inflamatorios. Además de inducir la secreción de IL-2 e IL-7 citocinas fundamentales en la linfopoyesis.

ABSTRACT

The hematopoiesis is a complex process by which all the cell lineages that make up the blood are generated from hematopoietic stem cells, which are located within the bone marrow, where they proliferate and differentiate into precursor cells, for myeloid and lymphoid lineage. Proliferation and differentiation of progenitor cells, they takes place within the hematopoietic microenvironment, which consists of various adhesion molecules and cytokines, these latter being primarily responsible for differentiation toward the myeloid or lymphoid lineage. Later differentiated cells are released into the bloodstream, to peripheral organs for further maturation and / or carry over their biological function.

Among the currently used therapeutic for the treatment of hematological diseases include: the use of hematopoietic growth factors such as G-CSF, GM-CSF and EPO, the use of biomolecules capable of modulating hematopoiesis, such as trans-retinoic acid (ATRA). In murine models currently tested with pro-inflammatory molecules to induce granulopoiesis and extramedullary lymphopoiesis B but inhibit the lymphopoiesis T.

Our working group has been shown *in vivo*, that the CasNa, a proinflammatory agent, mobilizes granulocytes and macrophages, induces increased concentration in serum and peritoneal exudate of M-CSF, G-CSF and GM-CSF, and allows survival of mice challenged with lethal doses of bacteria. But still not has been analyzed whether these effects are associated with inflammatory properties of CasNa on lymphopoiesis *in vivo*.

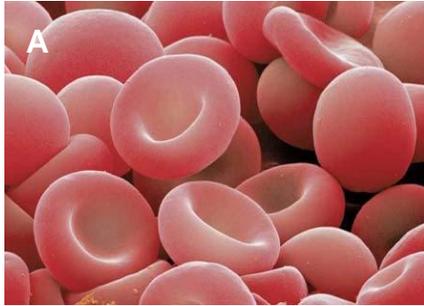
Our experiment showed that the CasNa, induced acute inflammation without reaching trigger chronic inflammation. That is a potent chemoattractant, increases response of phagocytes in the peritoneal cavity, induces B lymphopoiesis in spleen and T lymphopoiesis, data opposites to ther observed with another pro-

inflammatory agents. In addition to inducing secretion of IL-2 and IL-7 fundamentals cytokynes for the lymphopoiesis.

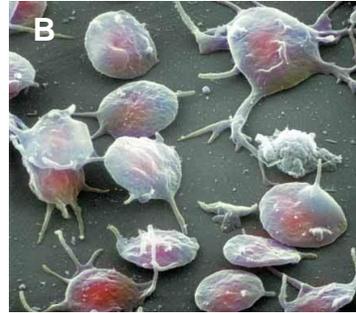
INTRODUCCIÓN

LA SANGRE.

La sangre es un tejido, formado por una parte sólida y otra líquida, esta última llamada plasma. El plasma está constituido por un 90% de agua, en el se hallan disueltas importantes sales minerales, como el cloruro sódico (NaCl), el cloruro potásico (KCl) y sales de calcio. Gracias a ellas pueden disolverse las proteínas en el plasma, para ser transportadas por la sangre, tanto la concentración de las sales como la acidez de los líquidos del cuerpo se mantienen dentro de límites estrechos de modo de no romper el equilibrio que existe entre el líquido que baña los tejidos y el intracelular. La parte sólida está compuesta por células o fragmentos celulares circulantes entre los que encontramos a los glóbulos rojos (GR) ó eritrocitos, plaquetas (Plt) y los glóbulos blancos (GB) ó leucocitos (Gutiérrez 2006) (Figura 1). Los GR son los encargados de cumplir con la vital función de transporte de oxígeno y de bióxido de carbono del cuerpo, a través de la hemoglobina, proteína que conforma más del 95% de contenido citoplasmático (Telen y Kaufman 1999; Kendall 2001). Las plaquetas se forman de la fragmentación de los megacariocitos; cumplen un rol muy importante en la homeostasis, en la trombosis y en la coagulación de la sangre, éstas se adhieren a los vasos sanguíneos dañados a través de una serie de pasos que involucran cambios morfológicos, tales como la extensión de pseudópodos, agregación y la secreción de gránulos para formar el denominado tapón plaquetario (Stenberg 1999; Kaushansky 1999).



Glóbulos rojos



Plaquetas

Figura 1. A) El eritrocito (ó glóbulos rojos) es un disco bicóncavo de más o menos 7 a 7.5 μm de diámetro y de 80 a 100 fL de volumen. B) Los trombocitos o plaquetas derivan de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos, de unos 3 μm de diámetro, irregulares, sin núcleo ni otros orgánulos. Tomados de www.lookfordiagnosis.com y <http://laphysis.blogspot.mx>.

Entre los leucocitos encontramos:

Leucocitos polimorfonucleares ó granulocitos: denominados así por los gránulos que presentan en su citoplasma. Existen tres tipos de granulocitos (Figura 2).

A) Neutrófilos, los cuales pertenecen al sistema inmune innato, son los primeros en actuar en caso de una infección o daño tisular. Estos se adhieren y avanzan sobre la superficie luminal de las células endoteliales, se mueven a través del tejido hacia el sitio del daño, cuando se encuentran en el sitio de lesión llevan se adhieren al agente etiológico mediante receptores, la membrana del fagocito rodea por completo al complejo de receptor y su ligando antigénico, la membrana se une en sus extremos y es liberada al interior de la célula un fagosoma. Una vez en el citoplasma el fagosoma se une a los lisosomas, formando el fagolisosoma, en donde se lleva a cabo la digestión del agente etiológico por la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas hidrolíticas (Skubitz 1999).

B) Eosinófilos; son de suma importancia en la defensa contra infecciones de parásitos, participando como fagocitos y células citotóxicas en presencia de complejos antígeno-anticuerpos (Ag-Ac) y componentes del complemento (Shi 2004).

C) Basófilos; circulan brevemente por el torrente sanguíneo antes de migrar dentro de las barreras de los tejidos, donde juegan un papel importante en las reacciones de hipersensibilidad inmediata, sus prominentes gránulos contienen un arsenal de mediadores de inflamación aguda, que incluyen histamina, serotonina, leucotrienos, activador del plasminogeno, entre otros (Arock 2002). Estos tres tipos de células tienen una vida relativamente corta y existe un incremento considerable de éstas durante respuestas inmunes inespecíficas.

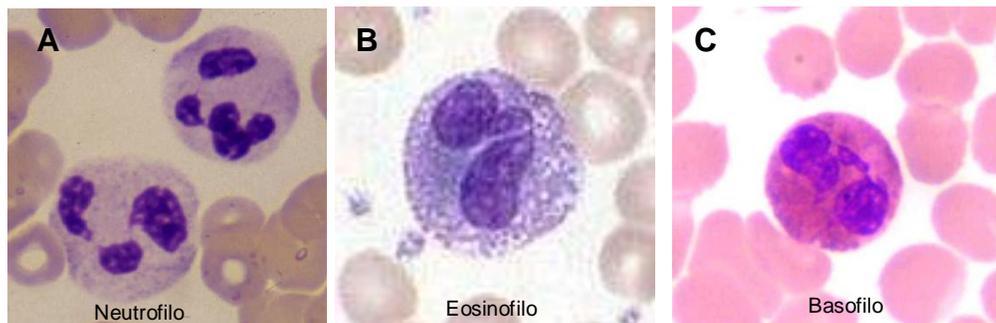


Figura 2: A) Neutrofilos: Miden de 12 a 18 μm , se tiñen con colorantes neutros se caracterizan por presentar un núcleo con cromatina compacta segmentada en 2 a 5 lóbulos conectados por delgados puentes. B) El eosinófilo maduro es redondeado, con un diámetro entre 12 a 17 μm y un núcleo generalmente bilobulado, se tiñen con colorantes ácidos (eosina) que les da un color rojo-carmín C) Basofilos; son células de unas 10 μm de diámetro y su núcleo tiene una forma que recuerda a una S, se tiñen con colorantes básicos, poseen gránulos de heparina e histamina. Tomado de www.hematologyatlas.com

Macrófagos: son la forma madura de los monolitos (Figura 3), están distribuidos ampliamente en todo el cuerpo, juegan una parte crítica en la inmunidad innata. Los macrófagos son por excelencia considerados como fagocitos profesionales. En la respuesta inmune adaptativa los macrófagos actúan como células presentadoras de Antígeno, promueven la viabilidad, proliferación y la secreción de citocinas y anticuerpos en linfocitos T y B, respectivamente (Randolph *et al* 2008, Seta *et al* 2007).

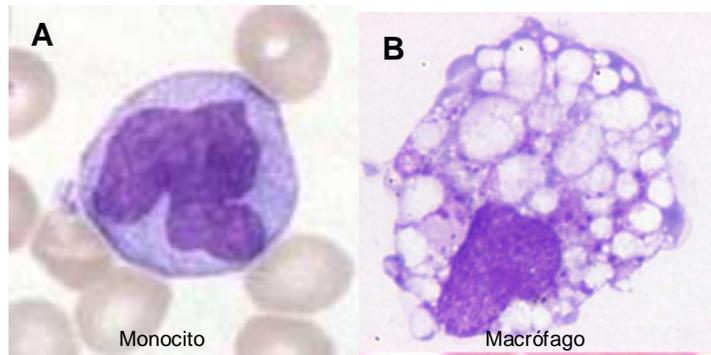


Figura 3. A) Monocito: es el leucocito de mayor tamaño, que varía entre 7 y 15 μm , Presenta un núcleo arriñonado (forma de riñón), que se tiñe de color violeta-azulado, el citoplasma es abundante y de color gris azulado pudiendo estar acompañado de vacuolas blanquecinas. B) Macrófago: se derivan del monocito abandona la sangre y penetra en los tejidos La transición de monocito a macrófago se caracteriza por crecimiento celular progresivo. El núcleo se vuelve redondo, aparecen nucléolos y el citoplasma se aprecia de color azul. Tomado de www.hematologyatlas.com

Linfocitos: Son las células encargadas de la respuesta inmune específica y adaptativa, existen de dos tipos, linfocitos B (LB) y linfocitos T (LT) (Figura 4). Los linfocitos B son los responsables de la inmunidad humoral mediante la síntesis y secreción de anticuerpos. Se desarrollan en la médula ósea y salen a la circulación como LB vírgenes, éstos al ser activados por los LT se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y LB de memoria. Los LB de memoria presentan en su superficie receptores altamente específicos, los cuales ayudan al reconocimiento de antígenos específicos, por lo tanto cada LB de memoria puede reconocer a un antígeno diferente y conjuntamente los receptores de todos los linfocitos reconocen una amplia diversidad de antígenos. Los linfocitos T se clasifican en LT citotóxicos, pertenecientes a la inmunidad celular, eliminan a células infectadas por patógenos intracelulares; Linfocitos T cooperadores, que al ser activados liberan diversas citocinas que se encargan de activar a diversas células del sistema inmune, macrófagos, polimorfonucleares, entre otras. Esta expresión de citocinas puede ser de dos tipos: Reacción tipo Th1, donde se liberan Interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β por sus siglas en inglés *Tumor necrosis factor*) las cuales regulan la respuesta celular; o reacción tipo Th2 donde liberan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 responsables de regular la respuesta humoral, tanto de LB como de LT. (Eden *et al* 2002, Cools *et al* 2007).

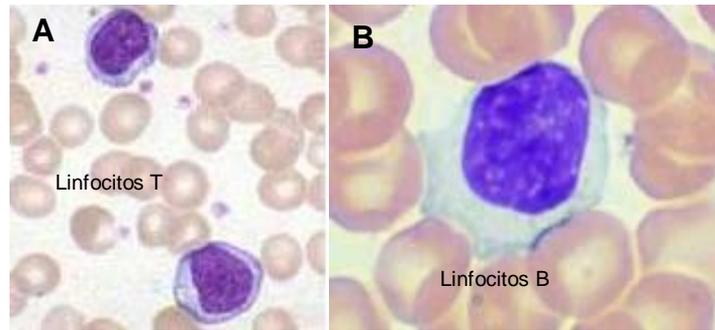


Figura 4. La mayoría de los linfocitos circulantes son linfocitos pequeños miden de 6-8 μm de diámetro. Existen linfocitos grandes que miden de 10 a 15 μm . Ambos presentan un núcleo esférico que se tiñe de violeta-azul y en su citoplasma frecuentemente se observa como un anillo periférico de color azul. Poseen un borde delgado de citoplasma que contienen algunas mitocondrias, ribosomas libres y un pequeño aparato de Golgi. Existen dos tipos Linfocitos T (A) y Linfocitos B (B), estas células son indistinguibles en frotis de sangre. Tomado de www.hematologyatlas.com

Células NK (del inglés natural killer): las células NK (Figura 5A) fueron originalmente descritas de acuerdo a su capacidad para matar ciertas células tumorales de origen hematopoyético en ausencia de una estimulación previa. Son de los principales componentes de la inmunidad innata, lisan selectivamente células infectadas por virus, pero no a células no infectadas. Están implicadas en varias actividades *in vivo*, como actividad contra células tumorales, resistencia a infecciones virales y en la regulación de la hematopoyesis. Las NK producen una serie de citocinas como Interferón gamma ($\text{INF-}\gamma$), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), Factor de Necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), IL-3 e IL-8 (Hallett 2004, Zamai *et al* 2007)

Células T asesinas naturales (NKT): Es una subpoblación particular, que expresan en la superficie el receptor antigénico (TCR) asociado con la molécula del complejo CD3 (*cluster of differentiation*) presentes en los linfocitos T, además de expresar el fenotipo característico de células NK (Figura 5B). Las células NKT reconocen antígenos de naturaleza glicolípídica en una presentación restringida por la molécula CD1d. Con base a esta estructura constante se les ha dado el

nombre de “células T invariantes restringidas por CD1d” o simplemente “células NKT invariantes” (iNKT) (Román 2006)

La función biológica de las células NKT es paradójica, porque pueden producir una amplia cantidad de citocinas tipo Th1 y/o Th2, con lo que pueden promover la inmunidad mediada por células en algunas ocasiones mientras que en otras pueden suprimir esta misma. Una explicación de este comportamiento es la existencia de distintos subtipos funcionales de NKT. Los cuales pueden dividirse en $CD4^+$ y $CD4^-$. En humanos células NKT $CD4^+$ puede producir tanto citocinas Th1 como Th2 (sobre todo $INF-\gamma$, TNF, IL-4, IL-10, IL-13), mientras que las NKT $CD4^-$ principalmente citocinas Th1 ($INF-\gamma$ y TNF). Estas células han recibido una considerable atención en años recientes dado que pueden modular la función de los linfocitos T y las células presentadoras de Antígeno (Coquet *et al* 2008, Haj *et al* 2007).

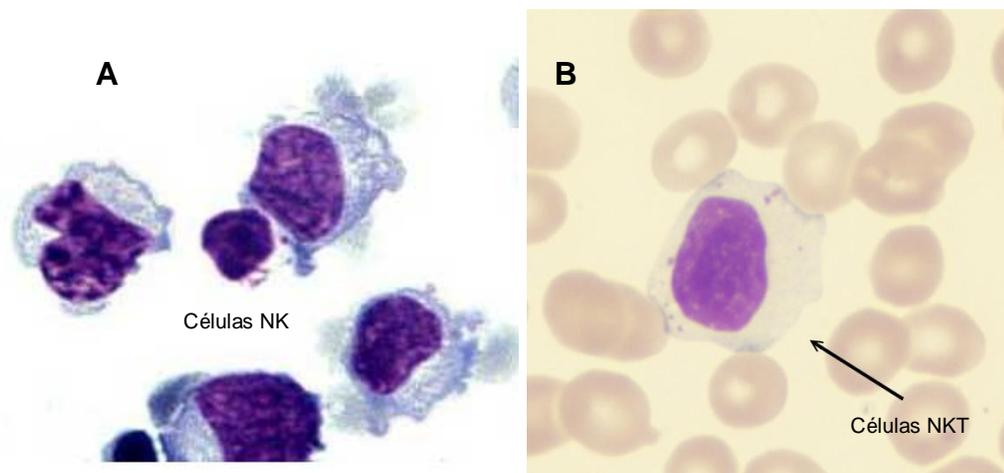


Figura 5. A) Células NK: Morfológicamente son prácticamente indistinguibles a los linfocitos grandes excepto por los gránulos que contienen: *perforinas*, *granzimas*, *factor de necrosis tumoral* tipo b (TNF- b) y proteoglucanos (condroitín sulfato A). B) Linfocitos NKT. Comparten algunas características de los NK y parte de las células T. Tomado de www.hematologyatlas.com

Células dendríticas (DC`s): están presentes en tejidos linfoides y no linfoides como piel, pulmones y mucosa intestinal. Las DC`s tienen llamativas prolongaciones retorcidas o dendritas, que se extienden desde su cuerpo (Figura

6). Son móviles, excelentes presentadoras de antígenos y proporcionan eficientes señales co-estimuladoras a células B y T (Ardavin 2001). Las DC's pueden dividirse por su morfología y su funcionalidad en dos subtipos: A) DC's mieloides (mDC's), dentro de las cuales encontramos a las células de Langerhans (LCs) y a las células intersticiales (intDCs); B) células plasmacitoides dendríticas (pDC's) (Kim *et al* 2007)

Los primeros reportes de las pDC's se remontan a 1958, cuando Lenner y Remmele reportaron un tipo de células similares a las células plasmáticas, pero deficientes en los marcadores de células tipo B. Las pDC's se producen en la médula ósea y circulan por la sangre y migran a tejidos linfoides: timo, nódulos linfáticos (LN), amígdalas, mucosa asociada a tejidos linfoides, placas de Peyer y bazo (Fitzgerald-Bocarsly *et al* 2008, Zhang *et al* 2005). Las pDC's en humanos tienen el inmunofenotipo $CD4^+CD45RA^+IL-3R\alpha(CD123)^+ILT3^+ILT1^-CD11c^-Lin^-$. En ratones las pDC's expresan los antígenos de superficie B220, Ly6C y CD11c, en baja proporción en comparación con las DC's. Tienen una baja afinidad del receptor Fc γ identificado en todos los estudios de células secretoras de INF, correspondiendo a Fc γ R1a (CD32) el cual modula la producción de INF tipo 1 (INF- α e INF- β) (Colonna *et al* 2004). También expresan subtipos de receptores tipo Toll (TLRs) como son el TLR7 y TLR9, los cuales le permiten detectar la presencia de DNA y RNA virales y Ag tumorales. Recientemente se ha analizado los TLR en la inmunología del cáncer y en la posibilidad de emplearlos en el tratamiento contra éste (Asselin-Paturel *et al* 2005).

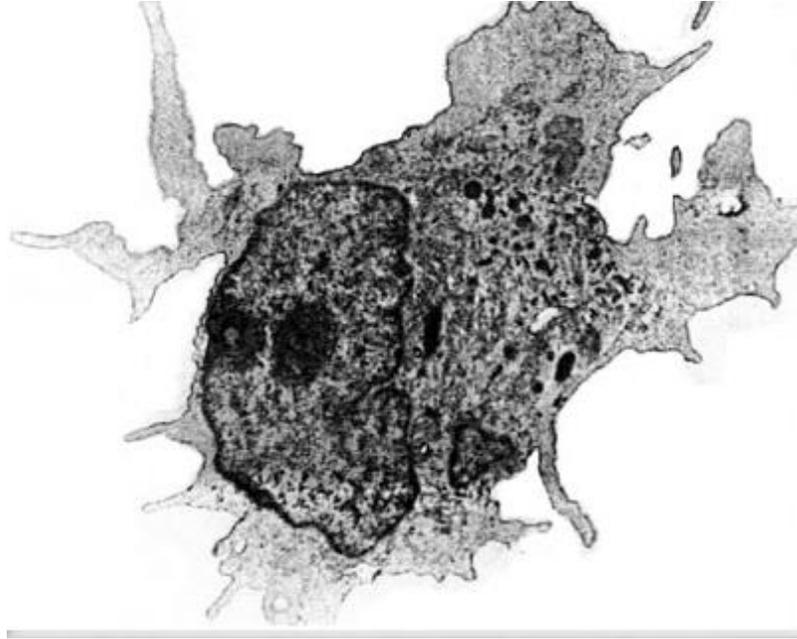


Figura 6. Células dendríticas: poseen morfología ramificada, cuando aún son inmaduras se asientan en la piel, las membranas mucosas, los pulmones y el bazo, allí engullen a los microorganismos invasores a través de los receptores caliciformes que poseen en su superficie y fagocitan virus y bacterias. Tomado de www.hematologyatlas.com

HEMATOPOYESIS

El proceso de la formación de las células de la sangre se llama hematopoyesis. El conjunto de células y estructuras implicadas en la fabricación de las células sanguíneas se llama tejido hematopoyético (Bellautono I 2004).

ONTOGENIA

Desde el punto de vista ontogénico, es decir desde la gestación de un individuo, en humanos los primeros elementos hematopoyéticos son detectados entre la segunda y tercera semana de gestación, mientras que en ratones es a los 7.5 días. La hematopoyesis extraembrionaria se lleva a cabo en el saco vitelino, durante esta hematopoyesis primitiva aparece el foco eritropoyético constituido por eritroblastos embrionarios quienes se desplazan a oxigenar los tejidos en formación (periodo mesoblástico). Durante este periodo también comienzan a aparecer algunos megacariocitos y a partir del día 9.5 aparece la hematopoyesis intraembrionaria en la región para-órtica esplenopleurea (pSP) en donde se gestan los progenitores de las células troncales hematopoyéticas (HSC; del inglés

Hematopoietic Stem Cells) (Li *et al* 2003). Entre los días 10.5 y 11.5 la hematopoyesis se desarrolla en la región aorta-gónada-mesonefro (AGM) y es allí en donde se desarrollan las primeras HSCs multipotenciales, las cuales principalmente dan origen a las células del estirpe mieloide (granulocitos, monocitos y macrófagos) (Barod 2003). Debido a que es precisamente en la región AGM en donde la presencia de diversos factores estimula el desarrollo y diferenciación de las HSC, a este conjunto de elementos tanto celulares como no celulares se denomina “Microambiente Hematopoyético”.

El microambiente hematopoyético es una estructura tridimensional altamente organizada constituido por células del estroma y sus productos (matriz extracelular, citocinas quimiocinas, etc.) los cuales regulan la localización y fisiología de las células hematopoyéticas (Mayani *et al* 2007). También está constituido por moléculas de adhesión, como los componentes de la familia Notch y el factor de crecimiento transformante- β (TGF β); Proteínas Morfogenéticas del Hueso (BMP), de las cuales se ha demostrado que la BMP4 es la responsable de regular la proliferación y diferenciación de las HSC en la región AGM (Marshall *et al* 2007, Yao *et al* 2007). Se ha observado que las HSC presentes en la región AGM tienen alta expresión del receptor Mpl, el cual es fundamental para el desarrollo de la hematopoyesis definitiva, debido a su interacción con *Runx 1*, uno de los genes involucrados en la aparición de las HSC definitivas (Petit-Cocaut *et al* 2007).

Alrededor del día 11 de la gestación la hematopoyesis se desarrolla en el hígado fetal (Fetal Liver; FL). Entre los días 12 y 16 en el FL existe una expansión considerable de las HSC, debido a que es aquí donde las células del estroma, como fibroblastos, células epiteliales y células de tipo macrófago, comienzan desarrollar redes para mantener la hematopoyesis, a partir de este punto algunas proteínas como la fibronectina, producidas por las células del estroma, desempeñan un papel crítico en la proliferación y diferenciación de las HSC (Tamiolakis *et al* 2007), alrededor del día 13 aquí comienzan a desarrollarse los eritrocitos definitivos y los progenitores de los linfocitos T y B. Es justamente en el

microambiente del FL en donde los precursores de las HSC sufren modificaciones que les permiten colonizar el timo rudimentario a partir del día 12 después de la gestación, el bazo aproximadamente al día 15 y finalmente la MO, sitio en donde se lleva a cabo la hematopoyesis definitiva durante la etapa adulta (Figura 7) (Chang *et al* 2005, Pelichovska *et al* 2008, Godin and Cumano A 2005)

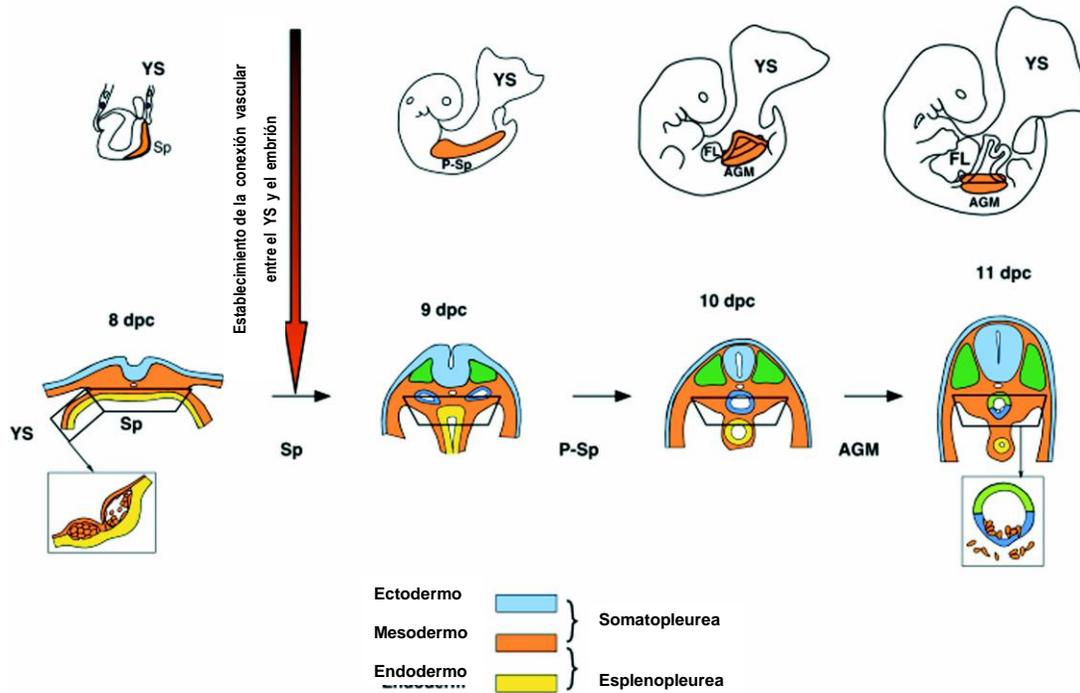


Figura 7 La hematopoyesis en el periodo embrionario podemos dividirlo en dos fases, en primer lugar una fase extraembrionaria que se desarrolla en el saco vitelino (YS: Yolk Sac) a partir del día 8 después de la gestación. Los precursores hematopoyéticos en el YS aparentemente están restringidos al linaje eritroide y a precursores mieloides que no se diferencian *in situ*. Los eritrocitos del YS se definen por presentar hemoglobina embrionaria y la presencia de núcleo. Entre los días 8.5 y 12.5 de la gestación, se genera la hematopoyesis intraembrionaria la cual se desarrolla en la región para-órtica esplenopleurea / aorta-gónada-mesonefro (P-sp/AGM), sitio en el que se desarrollan las primeras HSC las cuales ya presentan la característica de ser multipotentes y son capaces de reconstituir la hematopoyesis a largo plazo. dpc= días posteriores a la concepción. Tomado y modificado de Isabelle Godin and Ana Cumano. 2005

MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO

Posterior a los avances realizados por Till y McCulloch en la década de los 60's acerca de las Células Troncales Hematopoyéticas (HSC: Hematopoietic Stem Cells) (Hill & McCulloch 1961, Becker *et al* 1963) comienza los estudios para determinar el sitio

en el que se lleva a cabo la proliferación y diferenciación de estas HSC. Es Schofield en 1978 el primero en proponer el concepto de “nicho de células madre”. A través de observaciones al microscopio de la medula ósea Schofield desarrollo una serie de conceptos básicos sobre el nicho de las células madre: 1) es un sitio anatómicamente definido, 2) un lugar en donde las células madre puedan sustentarse y reproducirse, 3) un lugar donde la diferenciación es inhibida, 4) un espacio delimitado el cual también limita el número de HSC y posiblemente el más controversial, 5) es un sitio en donde las células con fenotipo de células madre pueden ser inducidas a un estadio un poco más maduro. Este nicho está compuesto por diversas poblaciones de células incluidas fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, adipocitos, osteoclastos entre otras, de las cuales unas se encargan del sustento y la reproducción de las HSC, mientras que otras son las responsables de mantener a las mismas en estado quiescente. Otro aspecto fundamental del nicho de las HSC es el sistema vascular (Papayannopoulou 2007).

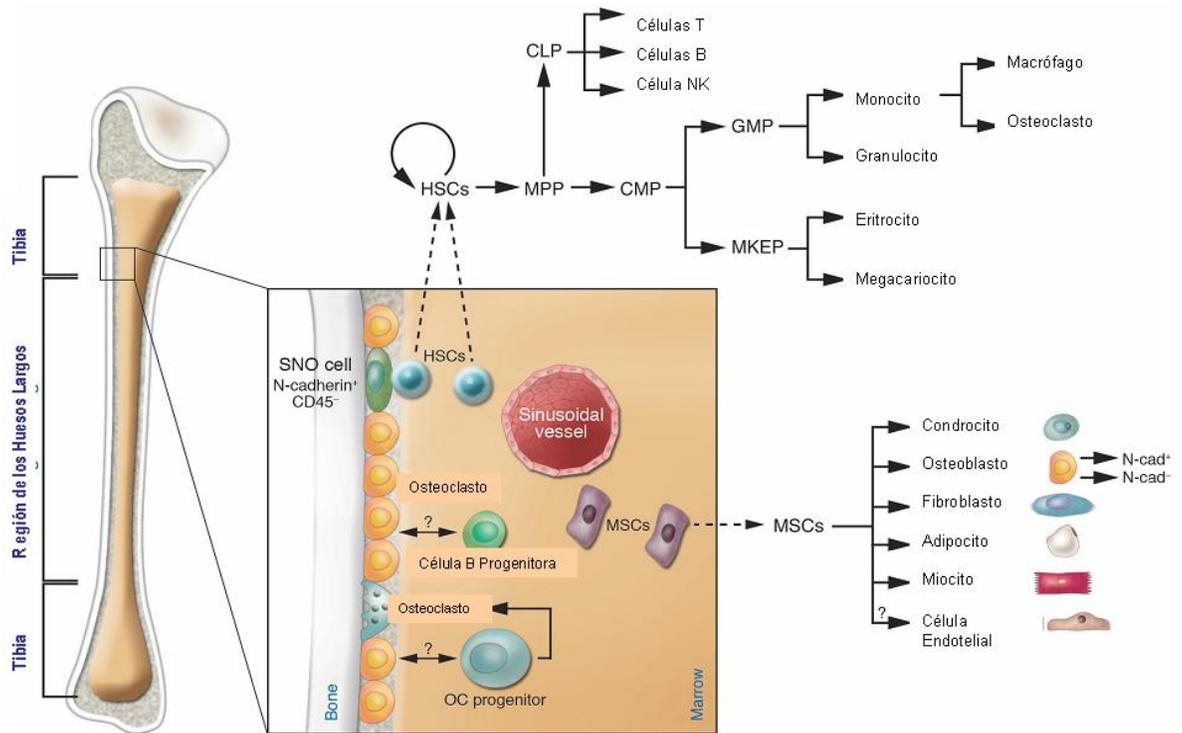


Figura 8. Las células madre mesenquimales (MSC's) también se encuentran dentro de la cavidad ósea, éstas darán origen a la mayoría de las células que componen la médula: condrocitos, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, células endoteliales y miocitos, las cuales junto con los osteoclastos, generan el microambiente que es irrigado por el sistema vascular. En donde se llevará a cabo la proliferación y diferenciación de las HSC, a partir de las cuales se generan los diferentes estirpes celulares que componen la sangre. Tomado y modificado de Yin and Linheng 2006.

Diversos trabajos han señalado a los osteoblastos como parte angular del nicho de las HSC (Figura 8), se ha demostrado que las características de las HSC de encontrarse en estado de quiescencia y anti-apoptosis en gran medida se debe a la interacción del receptor tirosina cinasa 2 (Tie2), expresado en las HSC, con su ligando angiopoietina-1 (Ang-1), expresado en los osteoclastos (Figura 8). La interacción Tie-2/Ang-1 estrecha la unión de HSCs con los osteoblastos y las mantiene en un fenotipo inmaduro (Arai F *et al* 2004). La expresión de Tie2 se incrementa mediante un efecto paracrino por el óxido nítrico (NO), producido por las células del estroma de la MO (Krasnov 2007). Por otro lado, estudios *in vivo* demostraron que la señalización de la Proteína Morfogénica Ósea (BMP; Bone Morphogenetic Protein) por el receptor BMP tipo IA (BMPRIA) incrementa la expresión de células de osteoblastos en forma de huso N-caderina⁺ CD45⁻ (SNO), las cuales presentan una correlación positiva con el número de HSC (Figura 9) (Zhang 2003). Los osteoblastos también regulan el comportamiento de las HSC mediante la expresión del ligando del receptor Notch-1 (Calvi 2003). La interacción Notch-1/ligando-Notch-1 tiene un papel fundamental para la proliferación y diferenciación de las HSC (Figura 9) (Chiba *et al* 2006). Estudios realizados durante el desarrollo embrionario del ratón han revelado la conexión entre mutaciones de los genes Notch y la presencia de síndromes de enfermedades congénitas en el humano, la mutación en Notch-1 acarrea el arresto de los linfoblastos T durante la maduración en el estadio doble positivo (CD4⁺CD8⁺), este evento correlaciona con el desarrollo de la Leucemia Linfoblástica Aguda T (LLA-T) (Santos *et al* 2006).

Se ha reportado que la interacción de la quimiocina- α del factor derivado del estroma (SDF-1) y su receptor exclusivo CXCR4 (SDF-1/CXCR4) tiene diversos efectos biológicos en el homing de las HSC dentro del microambiente de la MO: A) Induce respuesta quimiotáctica, B) Incrementa adhesión de las HSC debido al aumento en la expresión de VCAM-1, ICAM-1, fibronectina y fibrinógeno por la activación/modulación de diversas integrinas de superficie celular, C) Estimula la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y factores angiopoyéticos, por ejemplo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Mientras que la

ruptura de la interacción SDF-1/CXCR4 genera la motilidad de las HSC a la circulación (Kucia 2005).

Diversos trabajos han demostrado que, líneas celulares murinas primarias y transformadas de osteoblastos secretan citocinas que modulan las funciones de las HSC, por ejemplo G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-7, factor inhibidor de leucemia (LIF), TNF- α , ligando de NF- $\kappa\beta$ (RANKL), entre otros (Russell 2005).

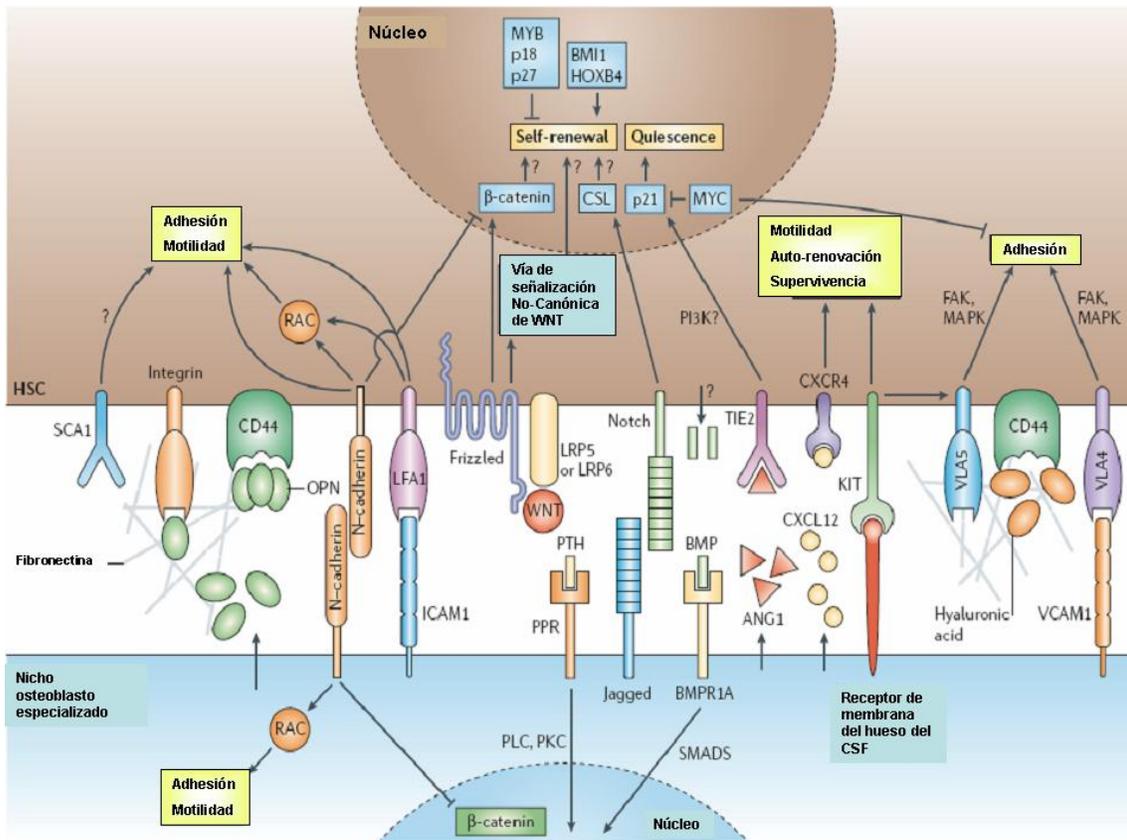


Figura 9. De las señales de intercambio entre los osteoclastos y las HSC encontramos: diversos receptores de membrana, proteínas de anclaje y de secreción de factores. Los receptores de membrana se encuentran ligados a cascadas intracelulares de señalización y participan activamente en la red que controla el mantenimiento de las HSC. ANG1, angiopietina-1; BMI1, represor policombinante; BMP, proteína morfogénica medular; BMPR1A, receptor BMP IA; CSL, CBF1 supresor de Hairless y LAG1; CXCL12, ligando 12 de quimiocina CXC; CXCR4, receptor de quimiocina CXC-4; FAK, cinasa de adhesión focal; HOXB4, homeobox B4; ICAM, molécula intracelular de adhesión 1; LFA1, función de linfocito asociada a Ag-1; LRP, proteína receptor asociado a lipoproteínas de baja densidad; MAPK, proteína cinasa activada por mitógeno; OPN, osteopontina; PI3K, fosfatidilinositol-3 cinasa; PLC, fosfolipasa C; PKC, proteínasina C; PPR, PTH/PTH-proteína relacionada al receptor; PTH hormona paratiroides; CSF, factor estimulante de células madre; SMADS, matriz contra decaptagenos-homólogos relativos; SNO, osteoblastos en forma de huso N-caderina+ CD45-; TIE2, receptor tirosina cinasa 2; VCAM1, molécula de adhesión vascular 1; VLA4, Ag 4 retardado; Se denotan moléculas y/o interacciones de las cuales solo se dispone de pruebas indirectas o contradictorias (Tomado y modificado de Willson A 2006)

Los tejidos hematopoyéticos de médula ósea, hígado y bazo, son irrigados por una serie de capilares altamente especializados, denominados sinusoides, los cuales se encargan de mantener la homeostasis en el microambiente y de integrar a las células, una vez maduras, a la circulación periférica (Figura 10). El nicho vascular de sinusoides es particularmente importante para el desarrollo de los megacariocitos, porque sus células endoteliales proveen de condiciones para la maduración de progenitores megacariocíticos (Slayton 2007). La adhesión, proliferación y diferenciación de los megacariocitos en el nicho vascular está regulado por: SDF-1, FGF-4, VCAM-1, receptor endotelial para angiopoyetina-2 (TIE-2) y molécula de adhesión de la célula endotelial plaquetaria (PECAM-) (Dhanjal TS 2007, Ross EA 2008).

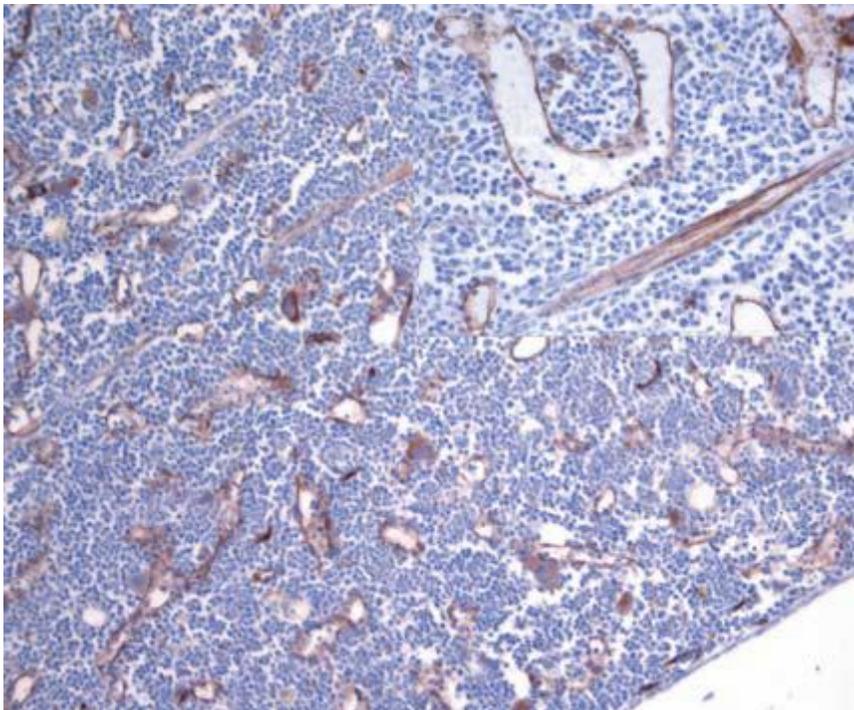


Figura 10. Sistema vascular de la MO, un microambiente hematopoyético el cual comprende diversas estructuras vasculares, provee de una barrera entre el compartimento hematopoyético y la circulación periférica. Es fundamental en la proliferación y diferenciación de los megacariocitos (Tomado de Hans-Georg 2005).

Otro microambiente altamente especializado es el Timo, categorizado como órgano linfoide primario; dentro de este las células precursoras derivadas de la médula ósea son diferenciadas hacia linfocitos T. Durante este proceso están involucradas diversas citocinas que inducen rearrreglos de genes de los receptores de células T (TCR). La interacción de los TCR con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), expresadas en las células que forman el microambiente del timo, determina la selección positiva o negativa, crucial para diferenciación de timocitos (Savino 2007).

El timo está compuesto por dos lóbulos, dentro de ellos se identifican dos regiones; la corteza compuesta por linfocitos (timocitos) células epiteliales y mesenquimales; una parte medular, conformada en su mayor parte por células epiteliales y menor número de linfocitos, con respecto a la corteza. Dentro de la medula se observan agrupaciones de células epiteliales, los cuales son denominados como corpúsculos de Hassall (Figura 11), dada su actividad en la secreción de citocinas influyen el desarrollo de los linfocitos. Además de estas células epiteliales y linfocitos el timo está compuesto por otro tipo de células, que incluyen macrófagos y células mieloides. En la colonización y diferenciación de los timocitos están involucradas algunas quimiocinas expresadas por las células del estroma y citocinas también secretadas por las mismas, como VCAM-1, IL-3 e IL-7, respectivamente (Nishino 2006)

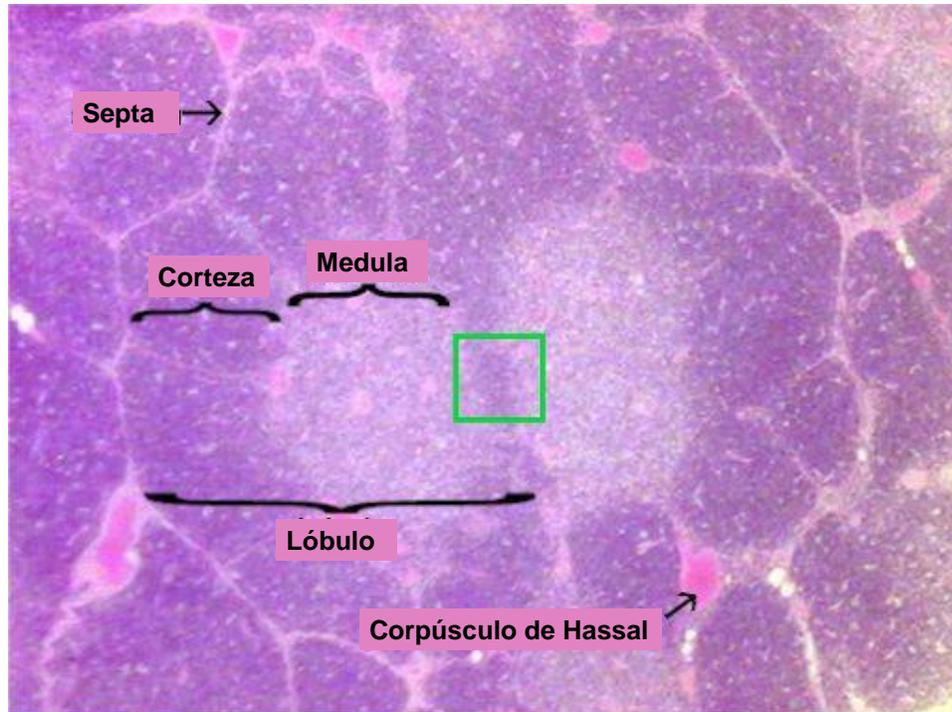


Figura 11. El timo es una glándula formada por lóbulos. Cada lóbulo tiene una corteza exterior y medula interna, están separados por tejido conectivo llamado septa. Los corpúsculos de Hassal tienen forma concéntrica. Tomado y modificado de <http://fisiologiadeltejido linfatico.blogspot.mx>.

CITOCINAS

Son glicoproteínas de bajo peso molecular, entre 15-30 KDa, constituidas por 120 - 180 aminoácidos. Originariamente se estableció el término linfocina para denominar productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta al antígeno. Posteriormente su uso se amplió a moléculas de características similares secretadas por otros tipos celulares, por lo que se utilizó el término más amplio de citocinas. El término interleucina (IL) se aplicó a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose consecutivamente a medida que se descubrían (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, etc.). No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *in vitro* y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del factor de necrosis tumoral (TNF: Tumor Necrosis Factor) y el factor transformador de tejidos (TGF: Transforming Growth Factor)

Las citocinas se encargan de regular diversos aspectos de la hematopoyesis y la respuesta inmune, particularmente de la inflamación (Tabla 1). Tienen la particularidad de actuar de forma pleiotrópica y/o redundante. La acción pleiotropica aparece como resultado de la acción conjunta con otras citocinas. Mientras que la redundancia puede explicarse por la convergencia de diferentes señales intracelulares de los receptores en una vía de “regulación maestra” (Cheng *et al* 2008). La producción de células hematopoyéticas es controlada por un grupo de citocinas hematopoyéticas. Estas citocinas presentan múltiples acciones mediadas por sus receptores cuyos dominios citoplasmáticos contienen regiones especializadas para iniciar varias respuestas: supervivencia, proliferación, diferenciación, maduración y activación funcional. Las citocinas pueden ser linaje específicas o dirigida hacia células de múltiples linajes, y para algunos tipos de células como HSC o progenitores megacariocitos la acción simultánea de múltiples citocinas es requerida para una respuesta proliferativa. Las mismas citocinas controlan el crecimiento y la proliferación de células hematopoyéticas en infecciones, aumento del número de eritrocitos para transporte de oxígeno (en personas que se encuentran en lugares elevados con baja concentración de oxígeno) ó por pérdida de sangre en caso de sangrados profusos (Metcalfe 2008).

CITOCINA/ CLASE	CELULA/TEJIDO PRODUCTOR	CELULA BLANCO	FUNCIÓN
EPO	Endotelio capilar peritubular de los riñones, hepatocitos	Progenitores eritroides	Proliferación y diferenciación de eritrocitos
G-CSF	Endotelio, macrófagos	Progenitores de neutrófilos	Crecimiento y diferenciación de neutrófilos
GM-CSF	Células Th	Células progenitoras	Crecimiento y diferenciación de neutrófilos, macrófagos y células dendríticas

CITOCINA/ CLASE	CELULA/TEJIDO PRODUCTOR	CELULA BLANCO	FUNCIÓN
M-CSF	Células epiteliales del tino (TEC), PMN, condrocitos, células meseniales del glomérulo, células Ishikawa	Linaje macrófago	Linfohematopoiético crecimiento y diferenciación de monocitos, incremento en la expresión de Ag de diferenciación y estimulación de quimiotaxis, fagocitosis y actividad citotóxica de monocitos
IL-1 α , IL-1 β Pro-inflamatoria	Monocitos, macrófagos, células B, células dendríticas	Células Th	Coestimulación
		Células B	Maduración y diferenciación
		Células NK	Activación
		Varias	Inflamación, fase aguda, fiebre
IL-2 hematopoyesis	Células Th1	Células B y T activadas, células NK	Crecimiento celular, proliferación, activación Síntesis de Ac
IL-3 (multi-CSF) Hematopoyesis	Células Th, células NK	HSC	Crecimiento y diferenciación
		Células cebadas	Crecimiento y liberación de histaminas
IL-4 hematopoyesis	Células Th	Células B activadas	Proliferación y diferenciación, síntesis de IgG ₁ e IgE
		Macrófagos	MHC clase II
		Células T	Proliferación
IL-5 hematopoyesis	Células Th2	Células B activadas	Proliferación y diferenciación, síntesis de IgA

CITOCINA/ CLASE	CELULA/TEJIDO PRODUCTOR	CELULA BLANCO	FUNCIÓN
IL-6 Hematopoyesis Pro-inflamatoria	Monocitos, macrófagos, células Th2, células estromales	Células B activadas	Diferenciación a células plasmáticas, secreción de Ac
		Células T	Coestimulador de células T
		HSC	Diferenciación
		Varias	Respuesta de fase aguda
		Neuronas, osteoblastos	Diferenciación neuronal, pérdida de hueso
IL-7	Estroma de médula ósea, Estroma de timo	HSC	En la diferenciación de progenitores de células B y T
IL-8 Quimiocina	Macrófagos, células endoteliales	neutrófilos	Quimiotaxis
IL-10	Células Th2	Macrófagos	Inhibición de la función de macrófagos, producción de citocinas
		Células B	Activación
IL-12	Macrófagos, células B	Células Tc activada	Dentro de la diferenciación de CTL (con IL-2)
		Células NK	Activación
	Monocitos, macrófagos,	Linfocitos T	Mediadora del crecimiento
			Proliferación

CITOCINA/ CLASE	CELULA/TEJIDO PRODUCTOR	CELULA BLANCO	FUNCIÓN
IL-15	células dendríticas, queratinocitos	Células NK	
		Varias	Desarrollo y mantenimiento de células efectoras del sistema inmune
INF- α	Leucocitos	Varias	Expresión de MHC I en la replicación viral
INF- β	Fibroblastos	Varias	Expresión de MHC I en la replicación viral
INF- γ	Células Th1, células Tc, células NK 24	Varias	Replicación viral
		Macrófagos	Expresión MHC
		Células B activadas	Cambio de Ig a IgG _{2a}
		Células Th2	Proliferación
		Macrófagos	Eliminación de patógenos
MIP-1 α Quimiocina	Macrófagos	Monocitos, células T	Quimiotaxis
MIP-1 β Quimiocina	Linfocitos	Monocitos, células T	Quimiotaxis
TGF- β	Células T, monocitos	Monocitos, macrófagos	Quimiotaxis
		Macrófagos activados	Síntesis de IL-1

CITOCINA/ CLASE	CELULA/TEJIDO PRODUCTOR	CELULA BLANCO	FUNCIÓN
		Células B activadas	Síntesis de IgA
		Varias	Proliferación
TNF- α Pro-inflamatoria	Macrófagos, células cebadas, células NK	Macrófagos	CAM y expresión de citocinas
		Células tumorales	Muerte celular
TNF- β Linfotoxina - α (LT) Pro-inflamatoria	Células Th1 y Th2	Fagocitos Células B	Fagocitosis, con producción de NO; activación de células efectoras en los sitios de infección, adhesión de leucocitos a células endoteliales, organogénesis de linfocitos periféricos, estimulación de células B
		Células tumorales	Muerte de las células a través de la inhibición de de la angiogenesis tumoral

Tabla 1. EPO, Eritropoyetina; G-CSF: Factor Estimulante de Granulocitos del ingles *Granulocyte Colony-Stimulating*; GM-CSF: Factor Estimulante de Granulocitos y Macrófagos del ingles *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating*; M-CSF, Factor estimulante de Macrófagos del ingles *Macrophage Colony-Stimulating*; IL- Interleucina; INF Interferón; MIP, Proteína Inflamatoria de Macrófagos del ingles *Macrophage Inflammatory Protein*; TGF, Factor de crecimiento Transformante del ingles *Transforming Growth Factor*; TNF, Factor de Necrosis Tumoral del ingles *Tumor Necrosis Factor* Tomado y modificado de Cambier *et al* 2007

Se ha observado, en modelos murinos deficientes en la producción de G-CSF, que otras citocinas asociadas a la mielopoyesis como GM-CSF, M-CSF, IL-3 ó IL-6, pueden compensar la pérdida de G-CSF, induciendo la proliferación y diferenciación de neutrófilos en estos ratones (Hibbs ML *et al* 2007). Dicho fenómeno puede explicarse debido a que los receptores de GM-CSF, M-CSF, IL-3 y Epo (entre otros) tienen regiones intracelulares en común, que al ser activada desencadenan una cascada de señales activando la expresión de genes y expresión de proteínas, induciendo así la proliferación y diferenciación de las células progenitoras (Kaushansky 2008). Otro ejemplo de ello es la familia de receptores

que comparten la fracción γ (γ_c), a la cual pertenecen los receptores de la IL-2, IL7 e IL-15, esenciales durante el desarrollo de la linfopoyesis (Figura 12).

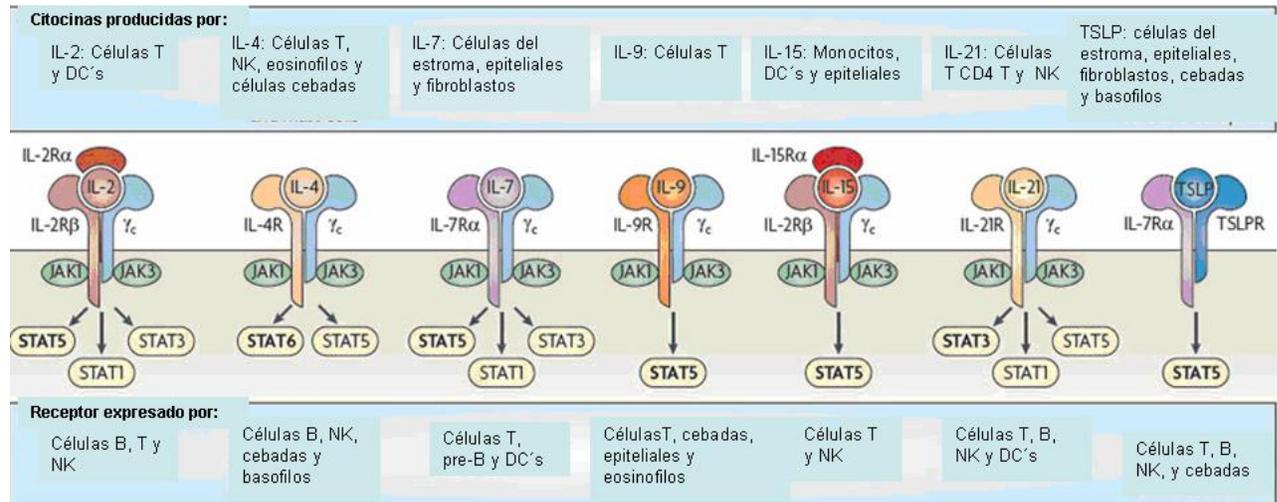


Figura 12. La fracción γ (γ_c) es un componente común en los receptores (R) de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. De estos receptores el IL-2R y el IL-15R están compuestos por tres subunidades (α , β , y γ) mientras que IL-4R, IL-7R, IL-9R e IL-21R solo están compuestos por dos subunidades (α y γ). Cada uno de los receptores de la familia de citocinas γ_c activa la cinasa Janus 1 (JAK1) y JAK3. Las proteínas principales de las señales de transducción y activación de la transcripción (STAT) son activadas por estos receptores de citocinas. Tomado y modificado de Rochman *et al* 2009.

Las citocinas hematopoyéticas presentan diversas funciones, además de la regulación del crecimiento y diferenciación de las HSC, debido a la presencia de receptores en varios tipos de células incluyendo células endoteliales, glía y neuronas, por ejemplo la EPO, G-CSF, GM-CSF las cuales tienen efecto tanto hematopoyético como no hematopoyético, este último concerniente a la inmunidad innata (Juul S and Federhoff U 2007). Estudios recientes tratan del efecto de las citocinas en la generación de osteoblastos y osteoclastos, como la IL-1 α , IL-1 β , IL-6 (entre otros miembros la familia de glicoproteínas 130), IL-7 y TNF- α directa o indirectamente promueven la osteoblastogénesis, mientras que IFN- β , INF- γ , IL-3, IL-4, IL-10, IL-13 e IL-12 solas o en sinergia con IL-18, entre otras, inhiben la formación de osteoclastos (Rauner *et al* 2007).

PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN

La generación de nuevas células sanguíneas a partir de las Células Troncales Hematopoyéticas (HSC; Hematopoietic Stem cells) se lleva a cabo mediante el proceso denominado cascada de hematopoyesis. De acuerdo a trabajos realizados en ratones, las HSC se definen como “células capaces de generar repoblación a largo plazo de células de todos los linajes hematopoyéticos en receptores irradiados letalmente” (Metcalf 2007). Las HSC tienen dos características fundamentales: son capaces de auto-renovarse y son multipotenciales, representan el 0.01% del total de las células nucleadas presentes en la MO. De acuerdo a experimentos de trasplante en modelos murino se han identificado dos tipos de HSC, las reconstituyentes a largo plazo (LT-HSC; long-term HSC) capaz de renovarse indefinidamente y las HSC de corto plazo (ST-HSC; short-term HSC) que pueden renovarse en intervalos definidos (Morrison and Weissman 1994). Las ST-HSC posteriormente se diferenciarán a los progenitores multipotentes (MPP; multipotent progenitor) con escasa o nula capacidad para autorenovarse, pero presentan la habilidad de diferenciarse a progenitores de linaje restringido que finalmente darán lugar a las células funcionales a través de pasos irreversibles de maduración. El progenitor común linfoide (CLP; common lymphoid progenitors) dará origen a los linfocitos T, linfocitos B y células NK, mientras que el progenitor común mieloide (CMP; common myeloid progenitors) es el progenitor del linaje mieloide-eritroide. El CMP da lugar al progenitor mielomonocítico (GMP; granulocyte myelocyte progenitor) que a su vez produce monocitos / macrófagos y granulocitos. El CMP también da origen al progenitor megacariocito / eritroide, que se diferenciará a megacariocitos / plaquetas y eritrocitos (Figura 13). Algunos trabajos mencionan que el GMP también mantiene un bajo potencial para diferenciarse hacia linfocitos B, además que, tanto CMP como CLP pueden generar células dendríticas (Passequé *et al* 2003).

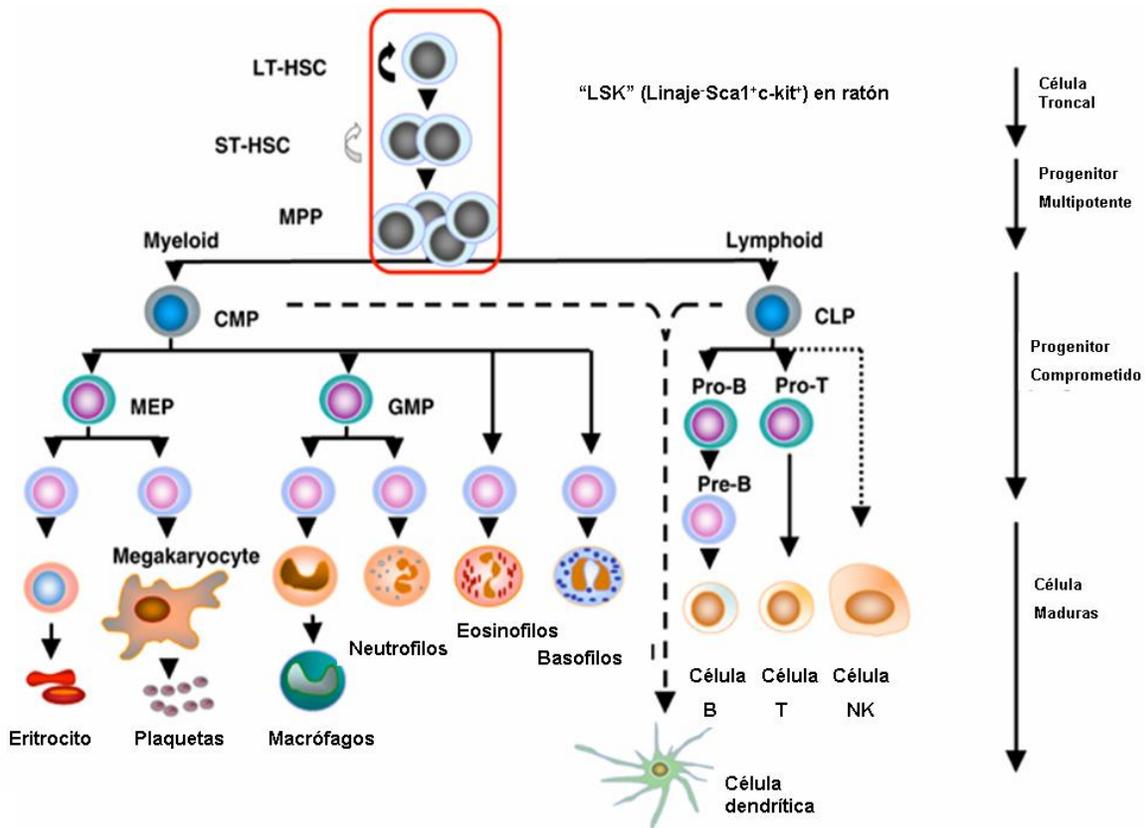


Figura 13. En el modelo convencional de hematopoyesis se observa que las HSC se auto renuevan y generan células precursoras con incremento en la restricción del linaje y el potencial de proliferar. Dentro de cada linaje la población de células incrementa con el aumento de la madurez. En una persona de 70 kg de peso se producen 2×10^{11} eritrocitos, 2×10^{11} plaquetas y 7×10^{11} granulocitos para compensar las pérdidas diarias. Tomado y modificado de Larsson and Karlsson 2005.

Existe otro modelo de hematopoyesis, el cual sostiene que los progenitores retienen la capacidad de diferenciarse hacia otro linaje, propone la existencia de un progenitor común para los linfocitos T, B y los macrófagos (Hou *et al* 2005) (Figura 14).

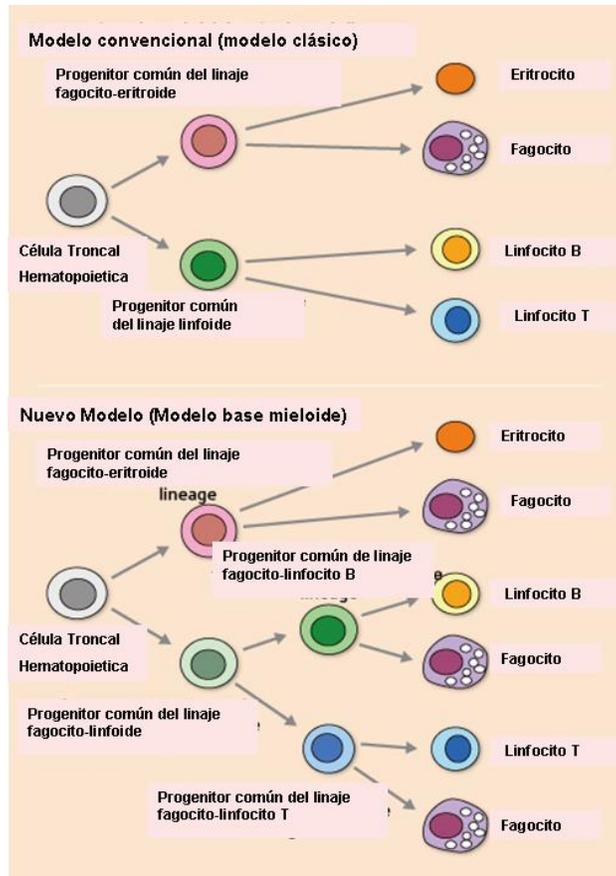


Figura 14. El modelo clásico (panel superior) supone la presencia de progenitores que son comunes a los linfocitos B y linfocitos T, mientras que el modelo basado en progenitor común (panel inferior) se propone que progenitores de fagocitos retienen la facultad de diferenciarse en células linfoides respondiendo a los diferentes estímulos externos diferenciándose en eritrocitos, linfocitos B y linfocitos T. Tomado y modificado de Kawamoto 2009.

Las moléculas de superficie de las células hematopoyéticas juegan un papel muy importante en el desarrollo y función de las células. En los humanos la nomenclatura para los grupos de diferenciación (CD; clusters differentiation) proviene de la reactividad de anticuerpos monoclonales (mAb) hacia Ag en la superficie de las células (Lai *et al* 1998). La diferenciación de las HSCs ha sido rastreada por la expresión de los CD incluyendo el receptor tirosina-cinasa. En humanos las HSC presentan el inmunofenotipo $\text{Lin}^{\text{neg}} \text{Thy1}^+ \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{neg/low}}$, mientras que las células progenitoras murinas expresan los siguientes marcadores T-HSC: $\text{Lin}^{-/\text{Lo}} \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{Sca-1}^{\text{hi}} \text{Thy1.1}^{\text{lo}} \text{Flk2}^{\text{neg}}$; ST-HSC: $\text{Lin}^{\text{neg/Lo}} \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{Sca-1}^{\text{hi}} \text{Thy1.1}^{\text{LO}} \text{Flk2}^+$; MPP: $\text{Lin}^{\text{neg/Lo}} \text{c-kit}^{\text{hi}} \text{Sca-1}^{\text{hi}} \text{Thy1.1}^{\text{neg}} \text{Flk2}^+$ (Figura 15) (Majeti *et al* 2007).

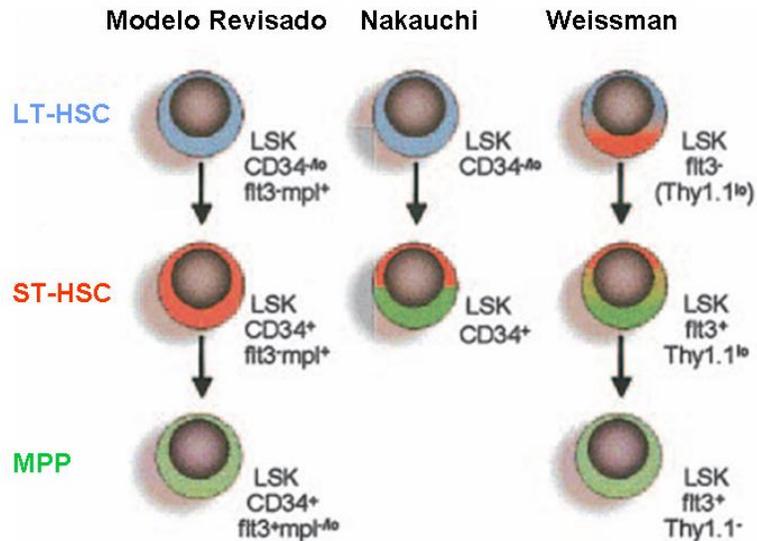


Figura 15. Nakauchi *et al* han definido a las ST-HSC como $\text{Lin}^- \text{Sca}^+ \text{kit}^+ \text{CD34}^+$ (LSKCD34⁺) sin más divisiones. Weissman *et al* han definido a las LT-HSC como $\text{LSKCD34}^- \text{flt3}^-$, en estudios recientes se han clasificado a las LT-HSC como $\text{LSKCD34}^+ \text{flt3}^-$ y a las ST-HSC como $\text{LSKCD34}^+ \text{flt3}^+$. Se ha demostrado que las ST-HSC $\text{LSKCD34}^+ \text{flt3}^-$ son capaces de reconstituir rápidamente la mielopoiesis mientras que las ST-HSC $\text{LSKCD34}^+ \text{flt3}^+$ la linfopoyesis. Adicionalmente, la población ST-HSC $\text{LSKflt3}^+ \text{Thy1.1}^{\text{lo}}$ podría superponerse a la población de MPPs $\text{LSKCD34}^+ \text{flt3}^+$. Tomado y modificado de Yang *et al* 2005.

Los CMP pueden ser identificados por los marcadores de superficie $\text{CD19}^+ \text{CD34}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD13}^+ \text{CD36}^+ \text{IL-3R}\alpha^+ \text{TPOR}^+$ (Chen *et al* 2007), estos progenitores tienen el potencial para generar unidades formadoras de colonias (UFC) de macrófagos, eosinófilos, eritrocitos y megacariocitos, de las dos últimas estirpes presentan un precursor común el MEP caracterizado con el inmunofenotipo $\text{Mpl}^+ \text{EPOR}^+ \text{CD41}^+$, la diferenciación entre los linajes eritroide y megacaritróide está regulada por la combinación de múltiples proteínas extra e intracelulares (Pang *et al* 2005). Los GMP se caracterizan por los marcadores $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{IL-3R}\alpha^- \text{CD45RA}^+ \text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{hi}}$ (Akashi *et al* 2000, Traver *et al* 2001). Se ha determinado que los progenitores de las células cebadas (MCP, también nombrados progenitores de Eosinófilos) podrían no tener su origen de CMP sino diferenciarse directamente de los MPP. Las MPP $\text{LSKCD34}^+ \text{IL5R}\alpha^-$ dan origen a las GMP y las MEP mientras que las MPP $\text{LSKCD34}^+ \text{IL5R}\alpha^+$ se diferencia a MCP (Figura 16) (Chen *et al* 2005, Mori *et al* 2009).

Durante la ontogenia y a lo largo de la vida adulta, la producción de las células linfoides B, T, NK y algunas categorías de las células dendríticas, se lleva

a cabo mediante un proceso dinámico y complejo en donde la diferenciación de los progenitores, la presencia de moléculas de superficie y la expresión de genes funcionalmente importantes de cada estirpe, comienza a ser activada mucho antes de que el compromiso sea completado (Welner 2007). El incremento en la expresión de *flt3* en las MPP induce a su diferenciación hacia el progenitor linfóide LMPP inmunotipificado como $LSKflt3^{hi}$, célula troncal que contienen factores primitivos transcripcionales con el potencial de generar los linajes B, T y NK. Posteriormente al ser expresado la subunidad α del receptor de IL-7 (IL-7R α , también conocido como CD127) se diferencia hacia las CLP (Sitnicka *et al* 2007). Existen trabajos donde demuestran, que la presencia de IL-7R α junto a la expresión de B220, incrementa el compromiso de los CLP hacia las estirpes B y T además de reducir el potencial de estos para generar células mieloides (Rumfelt *et al* 2006).

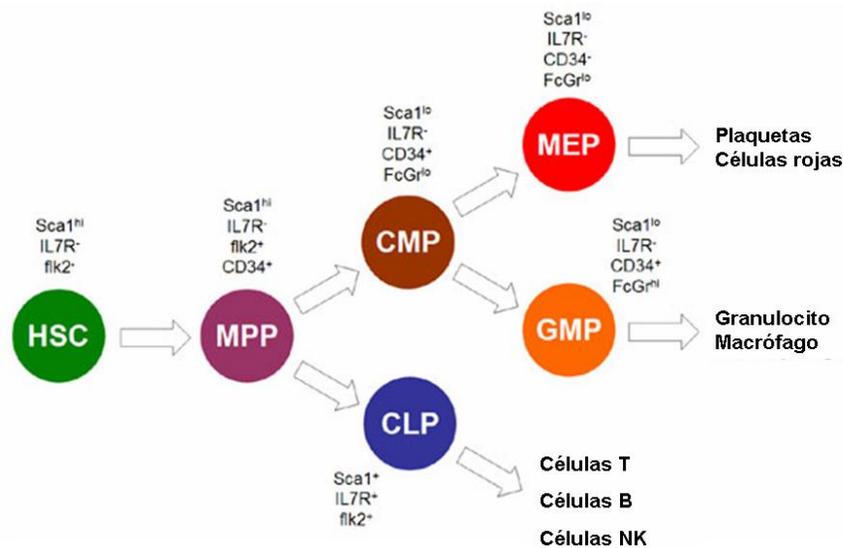


Figura 16. La expresión de proteínas de superficie se traduce en la diferenciación de los MPP hacia los distintos linajes. La presencia de proteínas de membrana juegan un rol principal en la diferenciación; en el caso de los CMP existe una disminución en el grado de expresión de *Sca1* y aparece el receptor de la fracción Fc de IG (FcGr); mientras que para los CLP la presencia del IL-7R α es fundamental en su compromiso hacia la estirpe linfóide. Tomado y modificado de Warren *et al* 2006.

Variaciones en los patrones de expresión de c-Kit es empleada para diferenciar categorías en CLP, los progenitores linfoides encargados de colonizar el timo expresan $c-kit^{hi}$ y aquellos que son $c-kit^{lo}$ generan células $CD19^{+}$, marcador presente en pro-B. Inmediatamente después del estado $CD19^{+}$ pro-B se genera la restricción del linaje basado en la expresión de CD45R/B220 (Pelayo *et al* 2005) El

desarrollo de los linfocitos B se lleva a cabo en la MO sus distintas etapas se caracterizan por reordenación de genes de inmunoglobulinas. Los CLP subsecuentemente se diferencian en pre-pro-B, pro-B y células B inmaduras (Figura 17) (Signer *et al* 2007). Durante esta diferenciación el reordenamiento del locus de Ig resulta en la expresión del receptor de células pre-B (pre-BCR) y finalmente el BCR maduro, capaz de realizar la unión de Ag. Durante este estado inmaduro de desarrollo, bajo un proceso de selección previene la generación de células B reactivas espontáneas, tanto los receptores de edición como de delección clonal tienen un papel fundamental en este estado. Las células que completan satisfactoriamente los puntos de control de la MO transicional a células B, eventualmente maduran a folículo maduro de células B (ó ZM: zona marginal de células B). Seguida de una respuesta inmune Ag específica, las células B se diferencian a células plasmáticas (secretoras de Ac) o de memoria (Cambier *et al* 2006).

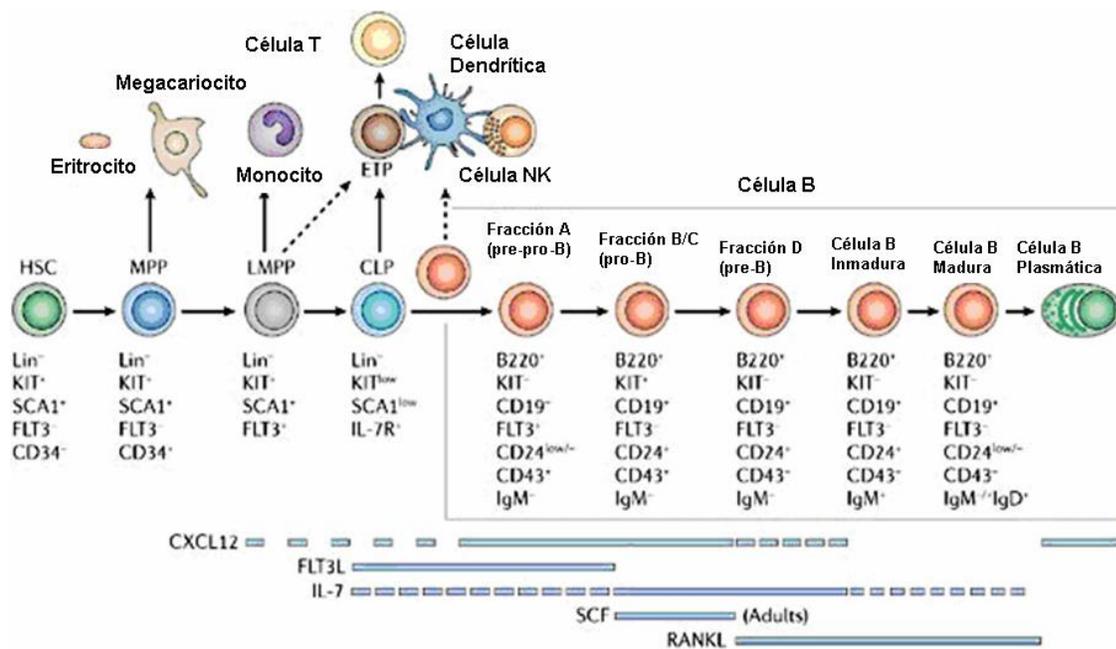


Figura 17. Podemos dividir a los precursores B en cuatro estadios de acuerdo a los marcadores de superficie presentes. Estas cuatro estadios son Fracción A (pre-pro-B), Fracción B (pro-B), Fracción C (pro-B) y Fracción D (pre-B). Las células B inmaduras son generadas de la fracción D, existen en la MO y alcanzan el bazo, estas generan las células periféricas maduras y las células plasmáticas. CXCL12 es esencial para la generación de pre-pro-B y pro-B y el homing de células plasmáticas en la MO. FLT3L es esencial para la generación de CLPs y pre-pro-B. IL-7 es requerida para la potencial diferenciación a células B de CLP y pre-pro-B y fundamental para la generación de pro-B y pre-B. CSF es importante de células estado pro-B de los adultos. El RANKL está envuelto en la generación de pre-B y células B inmaduras. Tomado y modificado de Nagasawa 2006.

En el timo se lleva a cabo la diferenciación hacia el linaje T (Heinzel *et al* 2007). Los CLP que migran hacia el timo expresan altos niveles del receptor Notch. La señal de Notch es un componente crucial durante el desarrollo intratímico, la inhibición de la señal Notch 1 en progenitores hematopoyéticos resulta en el desarrollo de células B en timo, y de forma contraria, la activación de Notch 1 causa desarrollo extratímico de células T a expensas de células comprometidas a linaje B en MO (Lai and Kondo 2008). Todos los estados más inmaduros de desarrollo de células T están caracterizados por las diferencias en la expresión de los marcadores CD44 y CD25; y la ausencia de CD3, CD4 y CD8. Debido a que no expresan CD4 o CD8, estas células son llamadas timocitos doble negativo (DN), y se subdividen en cuatro poblaciones; DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) y DN4 (CD44⁻CD25⁻) (Figura 18). Notch en conjunción con la señalización pre-TCR, es requerido para la transición de los LT del estado DN a DP; Notch influye en la selección positiva de timocitos simple positivo (SP) modulando la transducción de señales de los TCR en los timocitos DP (Laky 2008). Las células T producidas por el timo pueden expresar el receptor TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$ (Rolink *et al* 2006).

El desarrollo de LT es controlado por la transducción de señales de CD3, que se inician cuando péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (pMHC) comprometen a las fracciones α y β del heterodímero del TCR. En el desarrollo de los timocitos, la unión débil de TCR a sus ligandos genera selección positiva y una unión más fuerte genera selección negativa (Gil 2005), induciéndolas a apoptosis, asegurando así que existan linfocitos receptores de antígeno funcionales y eliminando posibles linfocitos autorreactivos. Otro factor importante en estos puntos de chequeo durante el desarrollo inmunológico de los linfocitos T son regulados por la familia de proteínas BCL-2, que se dividen en dos grupos, miembros pro- y antiapoptóticos, y los miembros de la familia de receptores TNF (Opferman 2008).

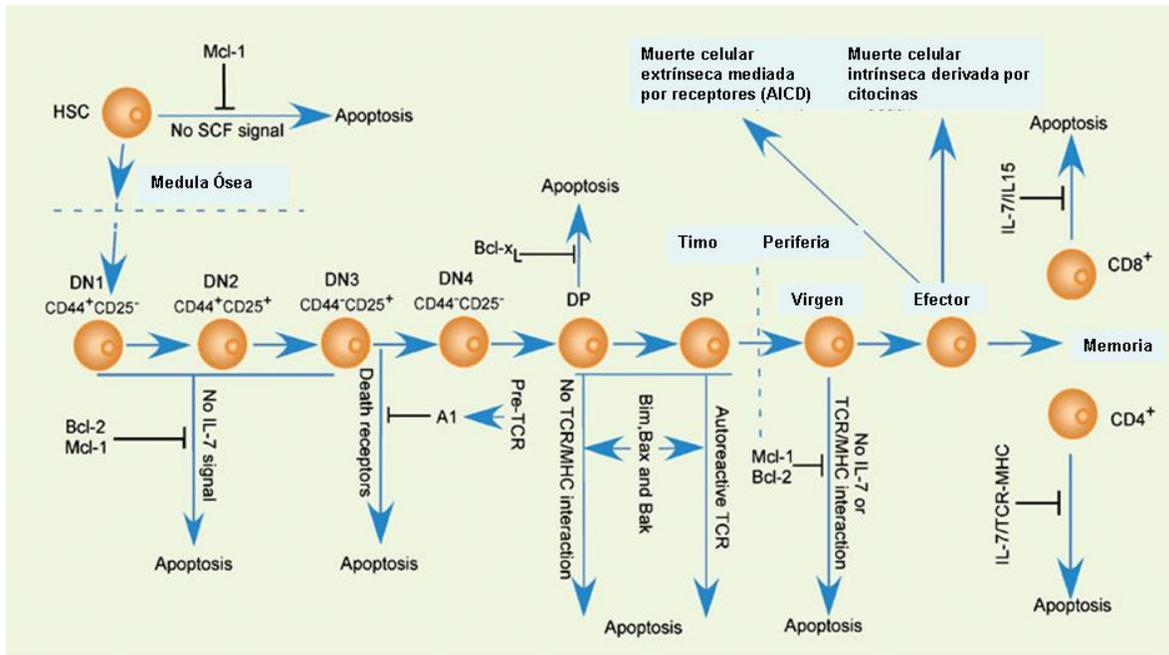


Figura 18. El rol de la apoptosis en el desarrollo y función de los linfocitos T. Se muestran las principales moléculas de las señales pro-apoptosis y anti-apoptosis. tomado y modificado de Zhang 2005.

IL-2, IL-15 e IL-7 son citocinas críticas para regular la homeostasis en la linfopoyesis, IL-2 es esencial para regular la diferenciación de los LT CD4⁺, IL-15 regula la diferenciación de LT CD8⁺ (Averil Ma *et al* 2006), IL-7 juega un papel fundamental en la linfopoyesis tanto en B como T, al igual que en el mantenimiento y la homeostasis de linfocitos (Figura 19) (Fry 2005). La maduración de los progenitores B en la MO es regulada por los BCR (B-cell receptor) y su interacción con los factores del microambiente, de los cuales se ha demostrado que IL-7 es el que tiene mayor influencia en el desarrollo del linaje B (Acosta-Rodríguez *et al* 2007). En experimentos *in vivo* empleando Ac para bloquear IL-7 o IL-7R se observó una rápida y severa disminución en el número de células del linaje B en MO y en el número total de timocitos (Milne 2006). En experimentos para determinar la función de IL-7 en el desarrollo de LT se ha determinado su función como cofactor en el rearrreglo de los genes de TCR β (Aspinall R 2006). Las distintas funciones fisiológicas de estas citocinas se atribuyen a las distintas vías de señalización iniciadas por las subunidades de los receptores. IL-2R, IL-15R e IL-7R los cuales tienen una subunidad en común la cadena γ (γ_c), también compartida por IL-4R,

IL-9R e IL-21R, hay que denotar que la γ_c solo es expresado por células de estirpe linfoide (Fry *et al* 2005)

Finalmente las perspectivas para identificar, aislar y caracterizar las células es conforme a su inmunofenotipo y sus propiedades metabólicas, en el caso de las células sanguíneas los marcadores de superficie específicos son: CD11b para células mieloides, Ter-119 para eritrocitos, CD3, CD4 y CD8 para linfocitos T y B220 para linfocitos B (Rosmarin 2005).

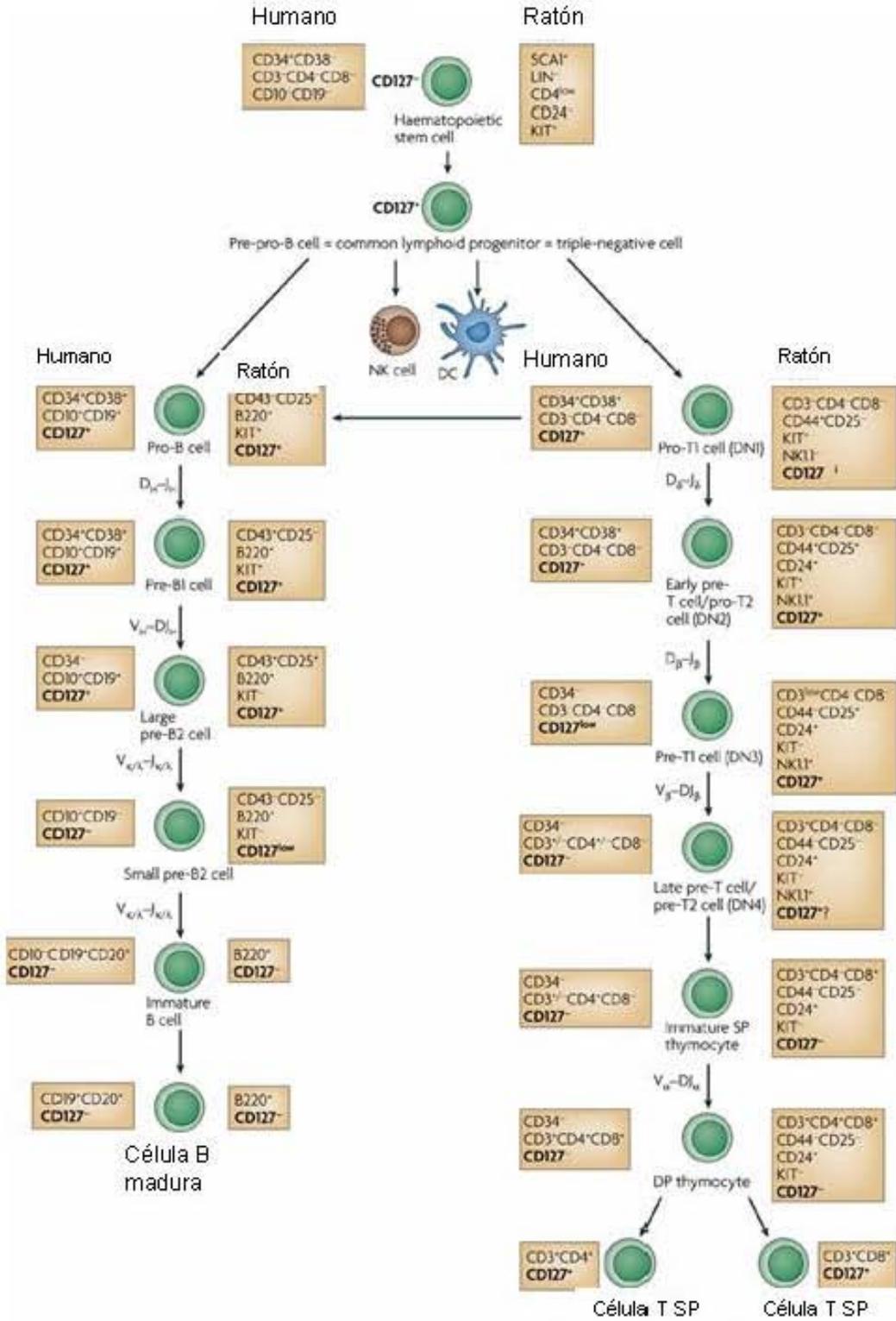


Figura 19. Las señales del IL-7R (CD 127) es crucial en muchos estados en el desarrollo y maduración de los linfocitos. Tomado y modificado de Mazzucchelli 2007.

TRANSTORNOS HEMATOLOGICOS

De acuerdo al sistema de clasificación de enfermedades hematológicas de la Organización Mundial de la Salud entre las neoplasias malignas se encuentran 1) Linfomas: Hodgkin, linfomas no-Hodgkin, linfomas B o T, 2) Enfermedades malignas inmunoproliferativas como mieloma múltiple y neoplasia de células plasmáticas, 3) Leucemias: leucemias mieloide; leucemia linfoide; leucemia monocítica. Además de leucemias y neoplasias malignas de células inespecíficas. En el caso de las leucemias podemos subdividir las en 3 subclasificaciones: aguda, crónica y subaguda. (OMS 2008). En todo el mundo, cerca de 250 000 personas son diagnosticadas con leucemia al año. Cada año se incrementa el número de víctimas de leucemia, en México se diagnostican más de 7 mil nuevos casos al año. Antes de que existiera un tratamiento, la mayoría de estos enfermos morían en los primeros 4 meses que seguían al diagnóstico. Hoy día en los países desarrollados en más del 90% de los pacientes que padecen leucemia linfática aguda (habitualmente niños) con el primer ciclo de quimioterapia, en combinación con otros tratamientos, controla la enfermedad. Mientras que en Latinoamérica los niños que padecen leucemia aguda solo tienen del 50% a 60% de probabilidades de supervivencia. Entre de las principales causas en la disminución de terapéutica exitosa se encuentran: tratamientos inespecíficos, invasivos, agresivos y también los altos costos de estos. Por lo que es imperante la búsqueda de tratamientos específicos, inocuos y accesibles para los pacientes.

Las diversas enfermedades hematológicas se originan de una colección de condiciones adversas, todas procedentes de las células de la MO y del sistema linfático (Rodríguez-Abreu *et al* 2005).

El aumento de los datos de varios tipos de cáncer en seres humanos sugiere que las células neoplásicas dentro de los distintos tumores son funcionalmente células heterogéneas a pesar de sus orígenes clonales. En particular el potencial de proliferación a largo plazo parece estar restringida a una

subpoblación de "Células troncales cancerígenas" (cáncer stem cells; CSC) funcionalmente definidas por su capacidad de someterse a la auto-renovación y dar lugar a las células diferenciadas que fenotípicamente recapitulan el tumor original (Ghosh *et al* 2009). Diversos estudios indican que las CSC quiescentes son resistentes a las terapias contra células en división. Dicha propiedad en conjunto con algunos eventos a nivel molecular promueven, en leucemias crónica, una crisis blástica (Jamieson 2008).

La actividad fisiológica de CSC así como las de HSC está regulado por más de 50 citocinas y más de 20 receptores de citocinas, de las cuales la relación SDF-1-CXCR4 es primordial para modular el tráfico tanto de HSC como de CSC (Kucia *et al* 2005). Otro mecanismo de importancia en la regulación del desarrollo celular es la vía de señalización del Factor de crecimiento Transformante- β (TGF- β ; Transforming Growth Factor- β), el cual es un polipéptido multifuncional que controla proliferación, diferenciación, el desarrollo embrionario, la angiogenesis, cicatrización de heridas y otras funciones de muchos tipos celulares. El TGF- β actúa como un supresor del tumor en las células epiteliales normales y en las primeras etapas de progresión tumoral (Nagathihalli and Pran 2010). Sin embargo en el caso leucemias y mieloproliferaciones malignas, linfomas y mieloma múltiple, las CSC han desarrollo mecanismos de resistencia vs TGF- β , como mutaciones o deleciones de las vías de señalización de TGF- β (Dong *et al* 2006).

En años recientes se ha determinado que en el caso de las neoplasias mieloproliferativas se deben en gran medida a mutaciones en JAK2 y el ligando del receptor de trombopoyetina MLP (Vannucchi *et al* 2009, Beer *et al* 2008). En estudios recientes se determinó el rol principal del complejo transcripcional multifactorial que contiene GATA-1, FOG-1 y Fli-1, el cual está involucrado en la diferenciación terminal de la megacariopoyesis, y que las alteraciones o mutaciones en alguno de estos factores origina las enfermedades hematológicas asociadas a megacariocitos, como la leucemia megacariocita (Pang 2005). Otra enfermedad de estirpe mieloide es la enfermedad crónica granulomatosa (CGD; Chronic

granulomatous disease), el trastorno más común de la función de fagocitos. En estos pacientes generalmente se presentan diversas infecciones recurrentes, primeramente afectan las barreras naturales como tracto respiratorio y nódulos linfáticos, y eventualmente órganos internos, como hígado, bazo, huesos y cerebro. El defecto molecular causante de CGD es la ausencia, baja expresión o mal funcionamiento de uno de los componentes de la NADPH oxidasa en los fagocitos, responsable de la acción microbicidas al generar especies reactivas de oxígeno (Newburger 2006).

TRATAMIENTOS CONTRA NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOLÓGICAS

El tratamiento de las neoplasias hematológicas ha sido el precursor de los trastornos neoplásicos en general, Por lo tanto, no es sorprendente que incluso en el ámbito de la terapia dirigida (ó inmunoterapia) el tratamiento de estos tumores malignos se mantiene en la vanguardia de la investigación. Aunque todos los tratamientos del cáncer (incluyendo cirugía, radioterapia y quimioterapia citotóxica) pueden considerarse terapias dirigidas contra el cáncer, el término “terapia dirigida” es más estrictamente definido para inmunoterapia dirigida o terapia dirigida molecularmente. Estos planteamientos se han desarrollado para reducir la toxicidad de la quimioterapia citotóxica inespecífica y para mejorar la eficacia del tratamiento (Kuriakose 2005). Las inmunotoxinas son un grupo de moléculas citotóxicas elaboradas artificialmente contra células cancerígenas. Estas moléculas están compuestas por una fracción de orientación, tales como un ligando o un Ac vinculados a la fracción de la toxina, dicha toxina se encarga ya sea de truncar o deletar el dominio de unión impidiendo que las células cancerígenas se unan a las normales. Las inmunotoxinas pueden dividirse en dos categorías: conjugados químicos inmunotóxicos y los recombinantes. Los conjugados tóxicos han demostrado tener limitada eficacia en pacientes con neoplasias hematológicas o tumores sólidos (Li *et al* 2005). En el caso de inmunotoxinas recombinante, el ligando y la toxina se encuentran codificadas en el ADN que se expresa en las bacterias, y la inmunotoxina purificada contiene el ligando y la toxina fusionadas. De las

inmunotoxinas recombinante más activas clínicamente probadas dirigidas contra neoplasias malignas hematológicas, se encuentra un agente que contiene la IL-2 y la toxina denileukin diftitox (diftérica truncada), las cuales fueron aprobadas para su uso contra linfoma de células cutáneas además han demostrado actividad en otras neoplasias hematológicas, como leucemias y linfomas. La toxina diftérica también se utiliza con otros ligandos, como el GM-CSF e IL-3, para tratamiento contra células de la leucemia mieloide. Esto se realiza mediante el complejo formado por la fusión de la exotoxina A trunca de *Pseudomonas* con anticuerpos monoclonales, los cuales son dirigidos contra células de diversos trastornos hematológicos, incluidos linfomas y leucemias (Kreitman 2009). En años recientes se han desarrollado terapias usando anticuerpos monoclonales marcados radiactivamente los cuales son empleados en combinación con quimioterapia para el tratamiento de linfomas y leucemias. El uso de estos anticuerpos monoclonales radioactivos tienen la clara ventaja de unirse muy rápido a los órganos y tejidos en donde están presentes los antígenos de células cancerígenas por lo que se reduce la toxicidad hacia los órganos normales, especialmente la médula ósea (Oyen et al 2007). El objetivo óptimo de la terapia con anticuerpos monoclonales sería un antígeno específico presente en alta densidad en las células tumorales, ausente o presente en bajas concentraciones en células normales (o presente en las células no críticas del hospedero) y con expresión estable sin modulación o internalización. En general, los anticuerpos monoclonales son seguros, bien tolerados y tienen actividad en una variedad de tratamientos clínicos. Sin embargo el empleo de estos en neoplasias hematológicas es complicado debido a la complejidad de antígenos presentes en las células hematológicas, por lo que el número de anticuerpos monoclonales así como de ensayos clínicos, tanto solos como en combinación de otros tratamientos ha crecido de manera exponencial (López-Guillermo 2007). La mayoría de los investigadores han utilizado CD-20 como un objetivo para radioinmunoterapia sobre la base de su expresión predecible en el 80% de los linfomas de células B. En linfoma han surgido dos enfoques básicos de trasplante aprovechando la expresión de CD20 como objetivo: 1. Dosis mieloablativas de radioinmunoterapia (RIT), con o sin quimioterapia, y 2. Dosis

estándar no mieloablativa de RIT en combinación con quimioterapia de alta dosis. Ambas seguidas de autotransfusión de HSC (Zhang *et al* 2008). A pesar de esto en las últimas 3 décadas se ha observado un patrón de mortalidad y morbilidad en pacientes con tumores sólidos y cáncer hematológicos, como resultado de una quimioterapia y/o radioterapia agresiva. Se han reportado por varios grupos la incidencia y latencia de linfoma secundario. El riesgo de un linfoma secundario aumenta después de los primeros 5 años de finalizada la quimioterapia o radioterapia y persiste por más de tres décadas. Lo que refuerza la necesidad de seguimiento a los pacientes expuestos a quimioterapia y confirma si los agentes empleados en la quimioterapia pudiesen inducir un linfoma (Krishnan 2007).

El postulado de que los tumores pueden ser identificados y posteriormente atacados por el sistema inmune (SI) data de finales del siglo XIX, cuando Ehrlich postulo la existencia de continuos derivados de “generaciones aberrantes” (tumores), donde el crecimiento y desarrollo de los mismos, a menos que sea detenido por el SI conducirán a la muerte. Gracias a las observaciones realizadas durante las décadas de 1950s y 1960s de espontáneas remisiones de ciertos tumores y la infiltración de linfocitos en estos, Burnett y Thomas formularon la teoría de la inmuno-vigilancia. En esta teoría se acepta la generación de células del cáncer como un fenómeno normal en el ser humano, y el SI se encarga de identificar y eliminar estas células antes de que se conviertan clínicamente en cáncer. El control de los tumores por defensas del SI es complejo. Puede ser mediado primeramente por el SI innato (fagocitos, células NKT, citocinas y proteínas del complemento, entre otros) y después por el sistema inmune adaptativo (células T y células B) (Bhardwal 2007). Hoy día un número diverso de terapias son destinadas a estimular el SI para eliminar el cáncer (Ortín 2005).

En modelos murinos la administración de agentes proinflamatorios como la toxina pertusis, estimula recíprocamente la granulopoyesis en la MO y linfopoyesis B extramedular en el bazo (Ueda *et al* 2004) al generar una modificación del microambiente hematopoyético, principalmente por la liberación, del TNF- α

durante el proceso inflamatorio, el cual genera la eliminación o disminución de interacción SDF-1/CXCR4, induciendo migración de HSC de la MO e inducir la liberación de IL-1 β , citocina encargada de expandir la granulopoyesis (Ueda *et al* 2005). Se ha observado que la administración intravenosa de componentes bacterianos como *Mycobacterium tuberculosis*, genera un incremento en la concentración en suero de GM-CSF y M-CSF, aumentando tanto *in vitro* como *in vivo*, el número de colonias de granulocitos, de monocitos y granulocitos macrófagos. Sin embargo a altas concentraciones, dichos componentes pueden generar lesión tisular, coagulación intravascular diseminada (CID) y shock endotóxico (Kaur *et al* 2004).

Dentro de las terapéuticas actualmente empleadas están el uso de factores de crecimiento hematopoyético como el GM-CSF, un importante factor de crecimiento hematopoyético y un potente inmunomodulador. Recientes investigaciones se centran en la aplicación del GM-CSF como adyuvante inmunológico por su capacidad para aumentar las células dendríticas (DC), así como de la maduración y activación de los macrófagos. Hoy día se emplea en la clínica para tratar la neutropenia en los pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia, durante el tratamiento del SIDA y después de trasplante de MO (Shi *et al* 2006). El G-CSF es empleado en donadores sanos para la recolección de células progenitoras periféricas para trasplantes alogénicos y para transfusión de granulocitos. Sin embargo la actividad del G-CSF no se limita al linaje mieloide, debido a la presencia del receptor de G-CSF en otro tipo de células y de tejidos, modula la expresión de una serie de citocinas implicadas en la inflamación (Anderlini *et al* 2008). La EPO actualmente se emplea para la recuperación de eritrocitos y disminuir los requerimientos de transfusión en pacientes tratados con quimioterapia (López-Hernández *et al* 2008).

En diversos modelos se ha observado que estos tratamientos pueden desencadenar un proceso inflamatorio, el cual aunado al estrés inducido desencadenan algunos efectos adversos como la desregulación en la interacción CD40-L/CD40 la cual es fundamental para el homing, maduración y diferenciación

de timocitos hacia CD4⁺ y/o CD8⁺ (Dunn *et al.*, 1997) induciendo algunas patologías de tipo autoinmune (Wagner *et al.*, 2002). En casos extremos las citocinas involucradas en un proceso inflamatorio pueden inducir la involución del timo, de estas se han identificado como agentes timosupresores a miembros de la familia de IL-6 (Gruver *et al.* 2008). Contrariamente los glucocorticoides, empleados ampliamente para la terapia anti-inflamatoria contribuyen a la regulación normal de la linfopoyesis, dado que tienen un efecto estimulador en los progenitores linfoides (Igarashi *et al.* 2005).

Existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta que modulan la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas (Fenaux *et al.* 2001). El ácido valproico ha sido usado por décadas como un anticonvulsivante. Recientemente se ha demostrado que además induce diferenciación y apoptosis en diversas células malignas. Por lo que es empleado en el tratamiento de LMA y síndrome de mielodisplasia, puede emplearse solo o en combinación del ácido trans-retinoico (ATRA), con el que se observa un efecto de sinergia (Kuendgen *et al.* 2007). El ATRA acelera la diferenciación del linaje linfoides B, incrementándolo substancialmente tanto en MO como en bazo (Chen *et al.* 2008). No obstante algunos de estos tratamientos tienen importantes efectos adversos, uno de los más graves es el denominado síndrome de ácido retinoico o síndrome ATRA (SAR). Este se caracteriza por fiebre sostenida, disnea, disstres respiratorio, infiltrados intersticiales pulmonares, derrame pleural y/o del pericardio, sobrecarga de volumen, hipotensión e insuficiencia renal aguda (Sastre *et al.* 2007).

Por más de 15 años el tratamiento estándar contra LMC es el trasplante de HSC, pero hoy día se cuenta con el Mesilato de Imatinib, una pequeña molécula que inactiva al BCR-ABL, tirocina cinasa central en la patogenia de la LMC (Mauro *et al.* 2006). Sin embargo, ambas terapéuticas conllevan un gran costo económico.

Las terapias que con éxito eliminan las células cancerígenas diferenciadas que caracterizan el cáncer rara vez pueden ser efectivas nuevamente porque las CSC son biológicamente diferentes. Nuevos métodos para un tratamiento eficaz

deben ser desarrollados, dado que los criterios tradicionales de respuesta como medir la masa del tumor, o la existencia de metástasis no pueden reflejar los cambios en las poblaciones de CSC (Huff *et al* 2006).

DERIVADOS DE LA LECHE Y LA SANGRE

Las proteínas de la leche contienen muchos componentes valiosos y sustancias biológicamente activas. Se ha determinado que las proteínas de la leche, pueden generar diversos compuestos biológicamente activos, encargados de modular varios procesos en el cuerpo. Como citomoduladores, que estimulan las células inmunocompetentes o de inhibir el crecimiento de células del cáncer (Meisel *et al* 2003).

Es ampliamente aceptado que la leche materna protege a los neonatos contra infecciones y reduce la incidencia de enfermedades atípicas, debido a la gran variedad de componentes solubles que contiene como anticuerpos IgA, lactoferrina, lisozima, entre otros. Pitt, Barlow & Heird (1977), reportaron que los macrófagos de la leche materna, juegan un rol fundamental en la prevención de enfermedades en ratas. También demostraron que los leucocitos presentan mayor actividad bactericida al cultivarlos en leche de rata que con formulas, Russel, Brooker & Reiter (1976) mostraron que caseína de le leche de vaca interfiere con la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares. Hughes (1985) analizó este efecto con macrófagos de cavidad peritoneal, incubándolos durante una hora con, calostro, fórmula láctea ó leche de vaca. Observó que fracciones de caseínas y la β -lactoglobulina se unían fuertemente a los macrófagos, a diferencia de la α -lactoglobulina, que tenia unión débil. Asumiendo que dichas uniones podrían ser las responsables de la disminución en la fagocitosis de complejos inmunes, al quedar ocupados los receptores Fc de los macrófagos por los compuestos de la leche. Un efecto similar pero menos pronunciado se presento en los cultivos con tioglicolato (Hughes *et al* 1985). En estudios posteriores obtuvo macrófagos de calostro y/o leche materna de humano exponiéndolos a

condiciones similares, observando que en ellos la inhibición de la fagocitosis de complejos inmunes era mínima o prácticamente nula (caso del calostro). Si no que al contrario los macrófagos de leche materna, al ser administrados por vía oral a ratas, presentaban mayor actividad protectora contra infecciones que los macrófagos obtenidos de cavidad peritoneal. Además que los macrófagos de cavidad peritoneal al ser resembrados en varias ocasiones con calostro, fórmula láctea o leche de vaca, el efecto de inhibición de fagocitosis era reducido. Por lo que el concluyo que *in vivo* los macrófagos al estar constantemente expuestos a la leche adquieren mayor capacidad de fagocitosis y de protección contra infecciones (Hughes *et al* 1988).

En modelos animales (mono) de hipoplasia aguda eritroide en infantes se observo que una de los factores de riesgo es una dieta baja en proteínas de la leche y que al suministrarlas adecuadamente, los individuos presentan una considerable mejoría (Ausman *et al* 1977). En 1985 gracias a las observaciones realizadas por Rönnholm en neonatos con bajo peso así como recuento de Hb y eritrocitos bajos, determino que la concentración de Hg está regulada estrechamente por la ingesta de proteínas de la leche materna y al administrarles suplementos de estas a dichos niños, incrementaron considerablemente su concentración de Hg y hematocrito (Rönnholm *et al* 1985). Posteriormente se determino que al disminuir la ingesta de proteínas de la leche genera una disminución en la concentración en suero de eritropoyetina y reducción de precursores eritroides con la subsecuente deficiencia en la eritropoyesis (Okano *et al* 1992).

CASEINAS Y HEMATOPOYESIS

En el interior del aparato de Golgi de las células del epitelio mamario se inicia la agregación y asociación de las distintas caseínas en partículas esféricas coloidales, conocidas como micelas de caseína (-CN), que le confieren la opalescencia característica a la leche. Las -CN son estructuras sólidas y esponjosas que tienen un diámetro de 160 nm. Están formadas por 98% de

caseína y 8% de sales (principalmente fosfato de calcio coloidal CCP) y constituyen el 80% de la proteína total de la leche. Estudios basados en la movilidad molecular (cromatografía, electroforesis, filtración y ultra centrifugación) han puesto de manifiesto que la micela de caseína se compone de 4 tipos principales de caseína individuales: α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ -CN que se encuentran en una proporción molar media de 3:0, 8:3:1 respectivamente (Ferrandini *et al* 2006).

Experimentos *in vitro* han demostrado que compuestos de caseínas presentan efecto inmunomodulador en células del sistema inmune (Migliore-Samour *et al* 1988, Miliorer-Samour *et al* 1989, Gattegno *et al* 1988). Se ha demostrado que la β -caseína activa la producción de radicales libres en granulocitos e induce la proliferación de linfocitos de carnero y de linfocitos T de pacientes con diabetes tipo 1 y 2 (Cavallo *et al* 1996). Se ha reportado que *in vitro* componentes de Caseína tienen un efecto inmunomodulador sobre los linfocitos T, induciendo la secreción de citocinas características de una respuesta del tipo Th-1, prevaleciendo la estimulación de la α -caseína para la secreción de INF- γ e IL-2 (Mao *et al* 2005a, Mao *et al* 2005b, Mao *et al* 2006, Mao *et al* 2007), mientras que β -caseína estimula la secreción de IL-2, además de tener la cualidad de ser un potente quimioattractor de monocitos y macrófagos (Laffineur *et al* 1996, Kitazawa *et al* 2007).

En experimentos *in vivo* en ratones se ha determinado que, la administración por vía oral de componentes de la caseína incrementa la actividad de fagocitos de sangre periférica y cavidad peritoneal, pero este tratamiento también induce inflamación (Kazlauskaitė 2005). Existen reportes que al inocular ratones por vía intraperitoneal (IP) con caseína o una sal derivada de la esta, el caseinato de sodio (CasNa), moviliza granulocitos y macrófagos al sitio de la inyección e induce incremento en las concentraciones en suero y exudado peritoneal de M-CSF, G-CSF y GM-CSF (Lotem & Sachs 1985, Metcalf 1996). También se ha observado que la inyección subcutánea de caseína permite la sobrevivencia de ratones inoculados con dosis letales de bacterias (Noursadegh 2002). Existen evidencias de que

los granulocitos y monocitos y otras células, como enterocitos, tienen receptores para caseína y CasNa (Hira *et al* 2003; Melo 2004)

Nuestro grupo de trabajo mostró *in vitro* que: el CasNa acelera la diferenciación de neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares de ratón; reduce la proliferación e induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de la línea celular mieloide 32D, incluyendo la inducción de la expresión de RNAm para el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y su receptor (M-CSFR), así como la proteína bioactiva de M-CSF (Ramos *al* 2000; Ramos *et al* 2004^a; Ramos *et al* 2004; Ramos G 2006).

Nuestros experimentos *in vivo* muestran que el CasNa incrementa en número de células e induce la proliferación del linaje monocito-macrófago y granulocito tanto en MO como en bazo (Santiago-Osorio *et al* 2006; Silvestre-Santana 2007).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen evidencias de que la inflamación induce la migración de HSC, expresión de citocinas responsables de la proliferación y diferenciación de linaje mieloide además de estimular la linfopoyesis B extramedular, pero también de que inhibe la linfopoyesis T. Por otro lado en experimentos *in vivo* se ha reportado que las caseínas así como el CasNa, una sal derivada de las caseínas, la cual es considerada como agente pro-inflamatoria, estimulan la activación y proliferación de células del linaje mieloide así como la expresión de las citocinas G-CSF, M-CSF, GM-CSF e IL-2. Sin embargo no se sabe si el efecto del CasNa *in vivo* está asociado a un proceso inflamatorio y cuál es su efecto sobre el linaje linfoide.

HIPOTESIS

Dado que existen evidencias de que la inflamación fomenta la mielopoyesis así como la linfopoyesis B extramedular. Además que las caseínas, *in vivo* estimulan la proliferación y diferenciación de estirpe mieloide así como de inducir la expresión de citocinas involucradas en la proliferación y diferenciación de la estirpe mieloide y de la linfoide. Por lo tanto el CasNa, al ser una gente pro-inflamatorio, estar compuesto de caseínas y considerando de que *in vivo* estimula la mielopoyesis. El CasNa *in vivo* promoverá la linfopoyesis B extramedular pero inhibirá la Linfopoyesis T.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del CasNa sobre la linfopoyesis B en medula ósea y extramedular así como de la linfopoyesis T en ratones inoculados por vía intraperitoneal.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar y clasificar la presencia del proceso inflamatorio en ratones tratados con CasNa.
- Determinar la activación de fagocitos en cavidad peritoneal en los ratones tratados
- Evaluar la concentración de citocinas linfopoyéticas, IL-2, IL-7 e IL-15 en suero de los ratones tratados
- Analizar las células de linaje linfóide B y T en medula ósea, bazo y timo

MATERIAL Y MÉTODO

RATONES.

Para este experimento se emplearon ratones BALB/c de 8 a 12 semanas de edad, los cuales fueron mantenidos y alimentados *ad libitum*, bajo condiciones estériles y libres de patógenos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Todos los experimentos fueron realizados bajo las leyes y normas mexicanas para el trato y protección de animales.

TRATAMIENTO DE RATONES.

Los ratones fueron divididos en 3 cuotas de 4 grupos y cada grupo era conformado por 5 ratones.

- El grupo control que no recibía tratamiento alguno,
- El grupo vehículo que solo recibía 1 ml de PBS,
- El grupo de tratamiento con CasNa que recibía 1 ml de PBS al 10% de CasNa (0.1g CasNa/1ml PBS)
- El grupo tratado con albúmina que recibía 1 ml de PBS al 10% de albúmina (0.1g albúmina/1ml PBS).

El tratamiento se realizó mediante inyección vía intraperitoneal (IP) cada 48 hrs., por 7 días. Al concluir este periodo los ratones fueron colocados en cámara de éter para ser anestesiados, se sangraron por vía axilar y finalmente sacrificados por dislocación. La sangre se separó por centrifugación y el suero resguardado a -20 °C hasta su empleo.

Una vez sacrificados los ratones se realizó un lavado de la cavidad peritoneal con 5 mL de solución de Krebs-Henseleit, mismos que se recuperaron y se mantuvieron en refrigeración hasta su empleo.

RADICALES LIBRES

Una vez sacrificados los ratones se realizo un lavado de la cavidad peritoneal con 5 mL de solución de Krebs-Henseleit, mismos que se recuperaron y se mantuvieron en baño de hielo hasta su empleo. Para evaluar la viabilidad de los fagocitos de los ratones de los diferentes grupos procedimos a analizar su capacidad de generar radicales libres durante la fagocitosis, mediante la prueba de reducción del nitroazul de tetrazolium (NBT) el cual en presencia de agentes reductores, en este caso por los ROS generados por los fagocitos, es reducido a formazan pasando de un compuesto incoloro a uno de de color.

TECNICA DE REDUCCIÓN DE NBT

Material:

- Tubos 13 X 100 siliconizados
- Baño metabólico
- Zymosan A opsonizado
- HCl 2.5 N
- Solución NBT al 1 %
- KCN 0.01 M
- Solución Krebs-Henseleit pH 7.4
- Piridina o cicloexano

Solución de Krebs-Henseleit pH 7.4

- NaCl (0.154 M) 0.89998g / 100 mL
- KCl (0.154 M) 0.0459g / 4 mL
- CaCl₂ (0.11 M) 0.0366 / 3 mL
- KH₂PO₄ (0.154 M) 0.0209g / 1 mL
- MgSO₄.7H₂O (0.154 M) 0.0379g / 1 mL

- Glucosa 250 mg / 130 mL
- NaHCO₃* 0.2725g / 21 mL
- KCN 0.065g / 100 mL
- HCl 2.5N 7.6 mL / 100 mL
- NBT 10 mg/ 10 mL SS
- Silicón 1 % 0.5 mL SIGMAcote / 50 mL

*El NaHCO₃ se agregan 10 mL y los 11 restantes se burbujan con CO₂ antes de adicionarse

Opsonización de Zymosan

Pesar 10 mg de Zymosan A y resuspenderlo en 5 mL de agua destilada, centrifugar a 2000 RMP durante 5 min. El sedimento se resuspende en 1 mL de suero fresco, se incuba a 37 °C durante 20 min. Centrifugar a 2000 RMP, decantar el sobrenadante, al sedimento se le adicionan 5 mL de solución de Krebs-Henseleit y se mezcla. Centrifugar a 2000 RPM durante 5 min. Decantar y el sedimento se resuspende en 1 mL de Krebs-Henseleit.

Identificar los tubos, dos por cada individuo y llenarlos de acuerdo a la siguiente tabla:

	REPOSO	FAGOCITANDO
Krebs-Henseleit	400 µL	350 µL
Zymosan opsonizado	_____	50 µL
KCN	100 µL	100 µL
NBT	400 µL	400 µL
Suspensión de células	100 µL	100 µL

- Incubar a 37° C durante 15 min
- Detener la reacción de todos los tubos (fagocitando y reposo) con 2 mL de HCl 2.5 N
- Centrifugar a 2000 RPM durante 15 min y desechar el sobrenadante (una vez hecho esto la reacción es estable)
- Adicionar 2 mL de piridina y se resuspenden todos los tubos (fagocitando y reposo)
- Leer a 515 nm, contra blanco de piridina y obtener los valores de Abs.

EXPRESIÓN DE RECEPTORES Fc

Para comprobar de viabilidad de fagocitos se procedió a evaluar la capacidad de los fagocitos para reconocer antígenos. Unos de los más relevantes es el realizado mediante los receptores para la fracción Fc de inmunoglobulina. Los cuales pueden ser evaluados mediante la técnica de formación de rosetas, en donde a través de opsonizar 1 mL de eritrocitos de carnero (EC) al 2% con 1mL de suero fresco de cobayo con anticuerpos anti-EC a 37° C por 20 min. Una vez opsonizados los EC fueron incubados con los fagocitos obtenidos de la cavidad peritoneal de los ratones en proporción 1:1 a 37° C durante 20 min. Los eritrocitos opsonizados con los anticuerpos anti-eritrocitos se adhieren a los macrófagos, a partir de 3 eritrocitos unidos a un macrófago se consideran una roseta

MARCADORES DE INFLAMACIÓN

CERULOLASMINA.

Como marcador de inflamación aguda se determino la ceruloplasmina que es una proteína sintetizada y liberada por el hígado al incrementarse la concentración de citocinas pro-inflamatorias (Oliveiro 2006). Se realizara su determinación en suero empleando la técnica de inmunodifusión radial. El

anticuerpo (Ac) anti-ceruloplasmina es incorporado en agarosa fundida, la cual es vertida dentro de una caja de Petri la cual se deja solidificar. Se cortan pequeños pozos dentro de la agarosa y estos son llenados con concentraciones conocidas de ceruloplasmina, con el objeto de construir una curva de calibración. Las muestras de suero de ratones se colocan dentro de otros pozos. La ceruloplasmina presente en el suero difundirá hacia fuera del pozo en un patrón circular rodeando al pozo. El anticuerpo anti-ceruloplasmina está presente en exceso y la difusión de la ceruloplasmina (antígeno) continuará hasta que se forma un precipitado antígeno-anticuerpo en forma de anillo estable.

OXIDO NÍTRICO.

Como marcador de inflamación crónica se empleó la determinación de nitratos como técnica indirecta para cuantificación de óxido nítrico, el cual es liberado por la acción del TNF- α . Este a bajas concentraciones ayuda a la permeabilidad de los vasos sanguíneos pero a altas dosis genera daño tisular (Klebanoff 1992). Se determinó en suero siguiendo la técnica Griess y Nacy, donde se determinan nitratos como indicador de la generación de óxido nítrico. Se realiza una mezcla en proporciones 1:1:1 de suero, agua bidestilada y reactivo de Griess, el cual se prepara usando una relación de 1:1 de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (NEDD) 0,1 %p/v, y sulfamida (SULF) 2 % p/v en ácido clorhídrico (HCl) al 5 %. Esta mezcla se homogenizó e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se determinó su absorbancia a 540 nm. Se preparó una curva estándar con nitrato de sodio (NaNO_2) utilizando como blanco agua bidestilada y reactivo de Griess (Adames *et al* 2008).

COMPRIMIDO DE ALGODÓN (PELLET)

La constante presencia de una respuesta inflamatoria aguda puede desencadenar una respuesta inflamatoria crónica. La cual se caracteriza por infiltración de células mononucleares, monocitos macrófagos, linfocitos e incluso

generar fibrosis, con lo que se llegan a formar granulomas. Por lo que procedimos a analizar la presencia de inflamación crónica mediante la técnica de formación de granulomas en un comprimido de algodón (pellet de algodón) colocado en los ratones (Balasubramiam *et al* 2011). Los pellet son pesados ($10 \pm 0,7$ mg) y esterilizados mediante autoclave (120° C, 15 Lbs durante 30 min). Los ratones son anestesiados en cámara de éter, en condiciones asépticas, se les coloca un pellet de forma subcutánea a la altura del cuello (cerca de la base del cráneo), mediante una incisión en la parte posterior del lomo y con ayuda de una varilla estéril, la incisión es suturada. Al finalizar el tratamiento a los ratones sacrificados se les extrajo el pellet, los cuales fueron secados a 60° C durante 24 hrs., (para obtener peso constante), una vez secos los pellets son pesados nuevamente.

ÍNDICE ESPLÉNICO Y TÍMICO

Los ratones fueron pesados, anestesiados en cámara de éter, sagrados por vía axilar y sacrificados por dislocación. Posteriormente se les extrajo el bazo y timo los cuales fueron pesados de manera individual. El índice fue determinado dividiendo el peso del timo o del Bazo entre el peso del ratón.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE BAZO

Los bazos se envolvieron en un filtro y se depositaron en cajas Petri con 4 ml de medio Iscove's, se exprimieron con un émbolo 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 4 ml de medio Iscove's y SFB al 10%. Posteriormente las células totales obtenidas fueron depositadas en tubos cónicos con 2ml de medio Iscove's y 10% de SFB, posteriormente se colocaron cuidadosamente en gradiente de densidad con Ficoll en tubos cónicos y se centrifugaron por 20 minutos a 500g para obtener las células mononucleadas, éstas fueron lavadas dos veces con medio Iscove's y SFB al 10%, y finalmente se realizó el conteo directo de células mononucleadas.

OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE TIMO.

Los timos obtenidos se envolvieron en un filtro y se depositaron en cajas Petri con 4 ml de medio ISCOVE´S, se exprimieron con un émbolo 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 4 ml de medio Iscove´s, SFB al 10 posteriormente se colocaron cuidadosamente en gradiente de densidad con Ficoll en tubos cónicos y se centrifugaron por 20 minutos a 500g para obtener las células mononucleadas, éstas fueron lavadas dos veces con medio Iscove´s y SFB al 10%, y finalmente se realizó el conteo directo de células mononucleadas.

VIABILIDAD Y NÚMERO CELULAR

Se evaluó en un hemocitómetro por medio de la incorporación de azul tripano (Sigma USA), con una dilución 1:1 con colorante azul tripano.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Una vez realizado el tratamiento con solo vehículo o CasNa los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal con bromodeoxiuridina (BrdU; 2 mg of BrdU/animal; BD Biosciences) 24 h antes de su sacrificio y después de la última dosis. Las células mononucleadas fueron obtenidas de médula ósea, bazo y timo mediante gradiente de densidad con Ficoll (1.077 g/L, Sigma, México) posteriormente la densidad fue ajustada a 2×10^6 en 1ml de PBS. Las células fueron teñidas con anticuerpos de superficie para anti-B220 marcado con Cy5 para el linaje linfocito B, anti-CD4 marcado con Cy5 PE y anti-CD8 marcado con PE para el linaje linfocito T. Para detectar la proliferación las células fueron fijadas para posteriormente ser permeabilizadas y teñidas con anti- BrdU marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de acuerdo con el protocolo del manual de

procedimiento del Kit de BrdU para citometría de flujo. Al finalizar el procedimiento de tinción, las células fueron resuspendidas en 0.3 ml de paraformaldehído al 1% en PBS. Los análisis de los fenotipos celulares y la incorporación de BrdU se realizaron en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA) con el software Pro v.5.1.1 BD (Becton Dickinson) de acuerdo a los manuales de procedimiento. Se adquirieron 50,000 células por muestra para cada análisis.

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS

Se llevaron a cabo la determinación de las citocinas IL-2, IL.7 e IL.15 mediante la técnica de ELISA con kits comerciales marca R&D y Biosciences de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La lectura de las placas se realizó 450nm en un espectrofotómetro SUNRISE de TECAN.

RESULTADOS

EL CasNa ES UN PROINFLAMATORIO

Los resultados de nuestros ensayos revelan aumento significativo del número de células (granulocitos y monocito macrófagos) en la cavidad peritoneal de los ratones que recibieron CasNa, respecto a los grupos control, vehículo y albúmina (Figura 20). Efecto similar al observado en ratones tratados con tioglicolato de sodio (TIO), agente pro-inflamatorio (Grenn *et al* 1984), confirmando así que el CasNa administrado por vía intraperitoneal, actúa como agente pro-inflamatorio promotor de la migración de células al sitio de la inoculación

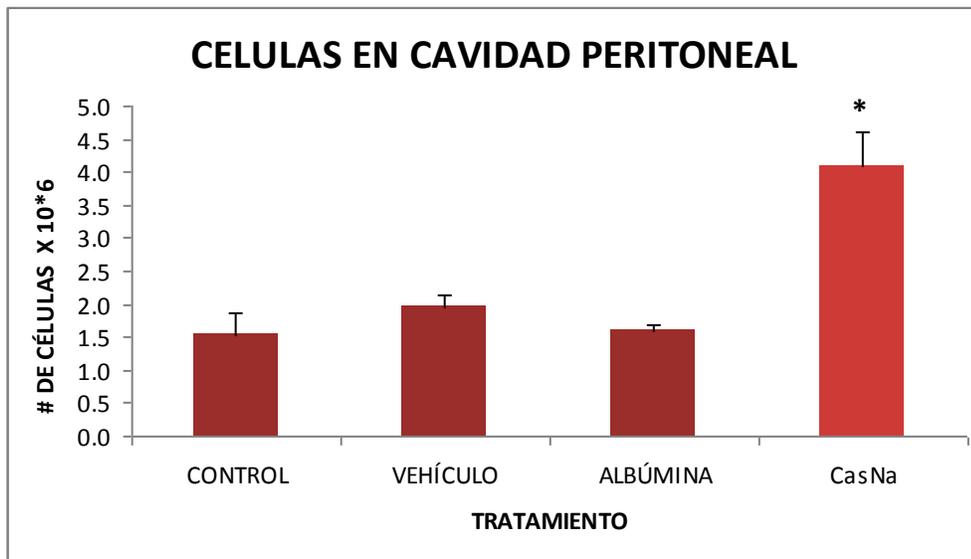


Figura 20. Número de células (predominando los granulocitos) en cavidad peritoneal de ratones sin tratamiento (control) y de aquellos que fueron tratados con vehículo, albumina (ALB) o CasNa. *Significancia estadística con $\alpha = 0.05$ con respecto al grupo control. Se realizaron 3 diferentes ensayos en los cuales se emplearon 5 ratones por grupo.

EL CasNa ACTIVA CÉLULAS PRO-INFLAMATORIAS

Una vez mostrado que el CasNa moviliza fagocitos (polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos) a la cavidad peritoneal (CP) de los ratones tratados, procedimos a determinar si los fagocitos presentes en la CP de los ratones inoculados con CasNa eran biológicamente funcionales. Para lo cual empleamos la prueba *in vitro* de reducción del NBT, el cual en presencia de agentes los ROS generados por los fagocitos es reducido a formazan, pasa de un compuesto incoloro a uno con color. Este efecto se midió mediante el uso del espectrofotómetro (Bellinati-Pires *et al* 1993). Los resultados indican que la reducción de NBT por parte de las células de CP provenientes de ratones tratados con CasNa presentaron mayor absorbancia que los grupos control, VEH y ALB tanto en condiciones básicas como al fagocitar levaduras (Figura 21).

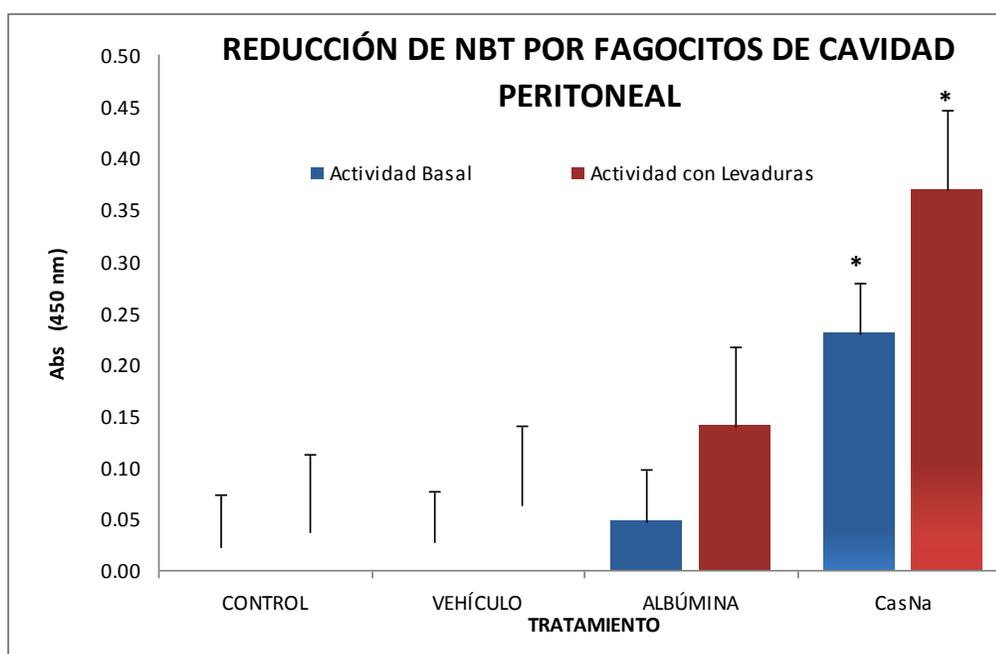


Figura 21 . Absorbancia por la reducción de NBT en los fagocitos extraídos de cavidad peritoneal de ratones sin tratamiento (control) y de los que fueron tratados con vehículo, albúmina (ALB) o CasNa. Las mediciones se realizaron en células sin levaduras o con levaduras. *Significancia estadística con $\alpha = 0.05$ con respecto al grupo control.

Otra prueba de funcionalidad celular de los fagocitos (polimorfonucleares, monocito macrófagos) es el reconocimiento de antígenos, mediante receptores de la fracción constante (Fc) de los Anticuerpos (Ac) (Bournazos *et al* 2009). Para evaluar la expresión de receptores Fc empleamos la técnica de formación de rosetas. En esta técnica se opsonizan eritrocitos de carnero (EC) con Ac anti-EC, las fracciones Fc de los Ac adheridos a los EC son reconocidas por los receptores Fc de los fagocitos, quedando unidos a la membrana de los fagocitos, estos al ser observados bajo el microscopio presentan una apariencia de rosetas de maíz. Se considera como roseta a aquellos fagocitos a los cuales se le han adheridos al menos tres eritrocitos.

En nuestros ensayos se observó un incremento significativo en el número de células formadoras de rosetas en los fagocitos de CP provenientes de ratones tratados con CasNa en comparación con los otros grupos (Figura 22).

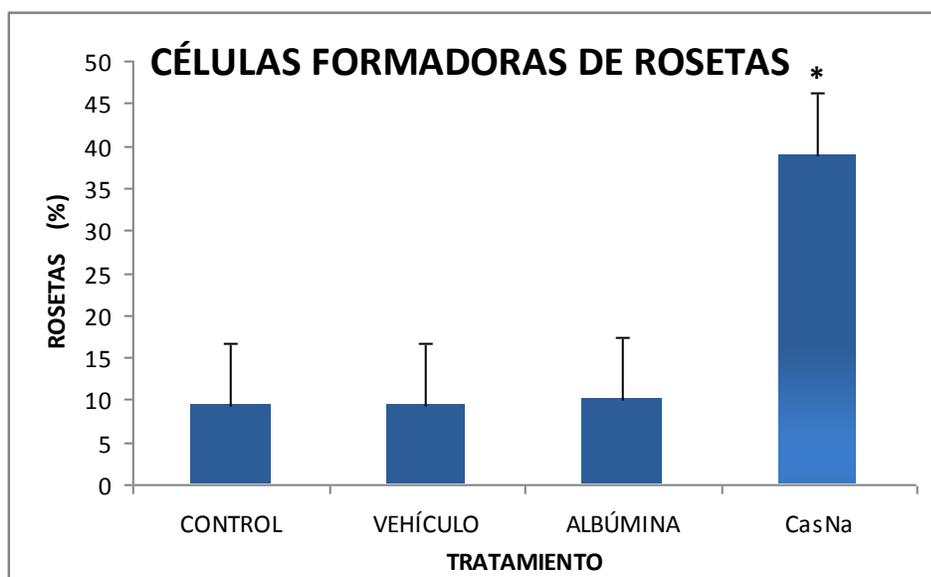


Figura 22. Porcentaje de células formadoras de rosetas en células extraídas de cavidad peritoneal de ratones sin tratamiento (control) y de ratones tratados con vehículo, albúmina (ALB) o CasNa. *Significancia estadística con $\alpha = 0.05$ con respecto al grupo control.

EL CasNa SOLO INDUCE RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA SIN PASAR A INFLAMACIÓN CRÓNICA.

La acumulación de células proinflamatorias es un evento contundente de inflamación, la cual puede ser aguda o crónica (Rojas et al 2009). Para evaluar la presencia de inflamación aguda se realizó la determinación de ceruloplasmina en suero por el método de inmunodifusión radial. De los datos obtenidos se observa incremento en la concentración de ceruloplasmina en los grupos que recibieron tratamiento con respecto al grupo control, pero solo en los ratones que recibieron CasNa tal incremento fue con significancia estadística. (Figura 23).

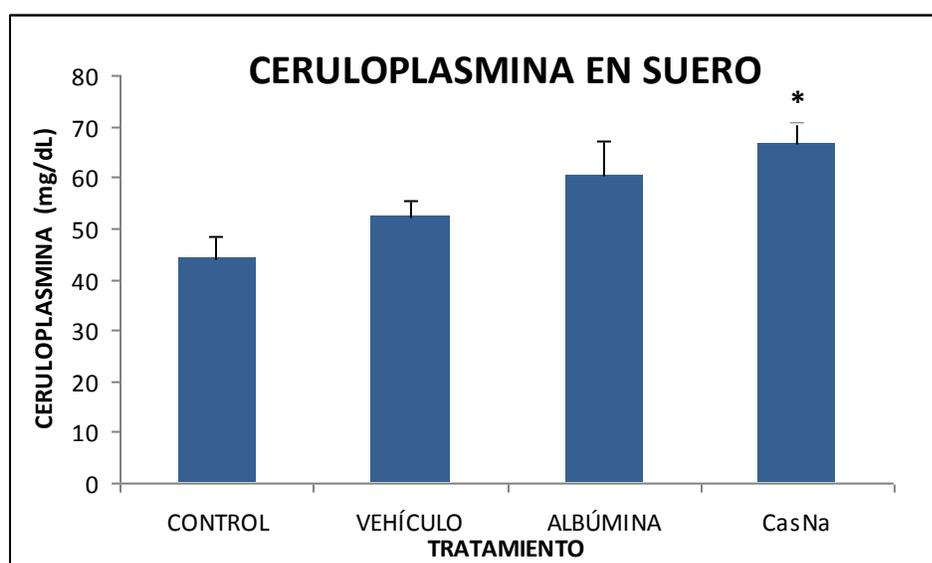


Figura 23. Concentración serica de ceruloplasmina en ratones sin tratamiento (control) y de aquellos que fueron tratados con vehículo, albumina (ALB) o CasNa. Significancia estadística con $\alpha = 0.05$ con respecto al grupo control.

La generación de óxido nítrico (NO) es estimulada por diversos factores físicos y biológicos, como los que ocurren en un proceso inflamatorio. En caso de existir un estímulo persistente, puede desencadenar una inflamación crónica y en consecuencia una liberación exacerbado de NO a la circulación (Takeichi 1998). El NO es liberado a la circulación, el cual es muy inestable y presenta una vida media de 6 a 10 segundos, el NO en el torrente sanguíneo reacciona con el radical superóxido (O₂) para formar nitritos (NO₂) la cual es una especie química más

estable (Farias 2007, Adames *et al* 2009, Zweier *et al* 2010). Motivo por lo cual decidimos realizar la cuantificación de nitritos en suero como determinación indirecta de NO, como marcador de inflamación crónica.

En nuestros ensayos no se observó diferencia significativa en la concentración de nitritos entre los diferentes grupos tratados con respecto del grupo control (Figura 24).

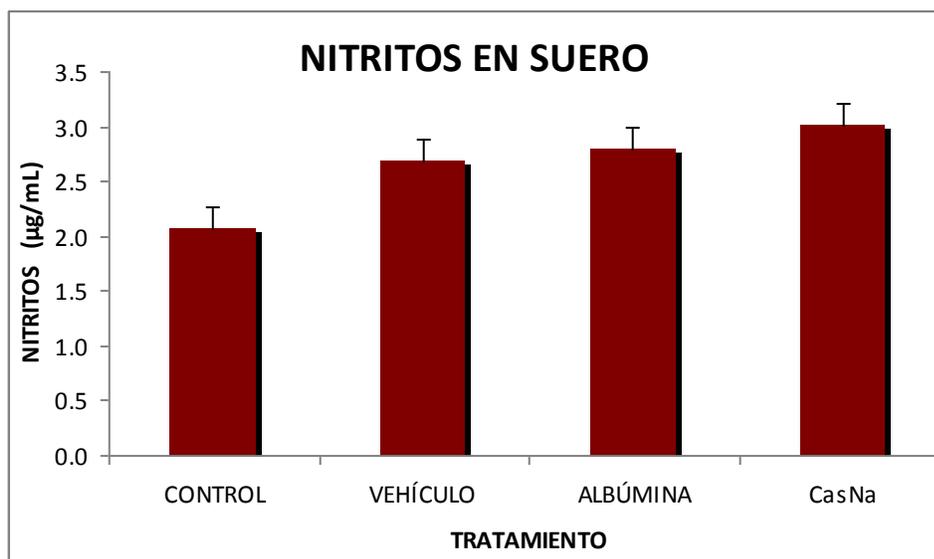


Figura 24. Concentración de nitritos en el suero de ratones control (sin tratamiento) y de ratones tratados por siete días con vehiculo, albúmina (ALB) o CasNa. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la diferentes grupos que recibieron tratamiento.

Para descartar completamente la presencia de inflamación crónica, analizamos el peso de un pellet de algodón colocado en el lomo de los ratones de los diferentes grupos. Durante un proceso inflamatorio crónico la secreción de exudados y la migración constante de células generan que éstos se acumulen en el pellet, por lo que al ser extraído y pesados será mayor el peso de los pellets en aquellos individuos que cursaron por un cuadro inflamatorio crónico (Marroquín-Segura *et al* 2009). De los datos obtenidos se determinó incremento significativo en el peso del pellet en aquellos ratones que únicamente recibieron VEH (Figura 25).

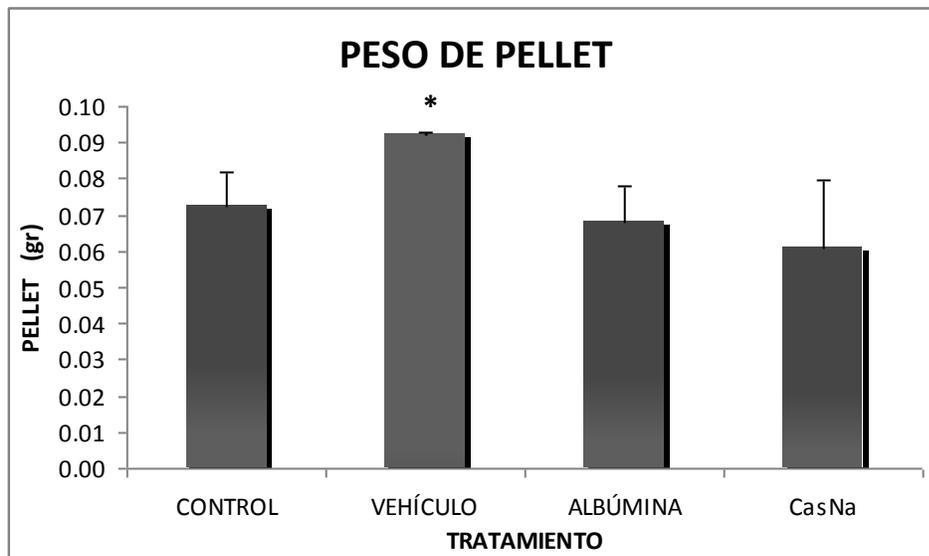


Grafico 25. Peso en gramos del comprimido (pellet) de algodón colocado en el lomo de ratones sin tratamiento (control) y de ratones que fueron inoculados con vehículo, albúmina (ALB) o CasNa. Significancia estadística con $\alpha = 0.05$ con respecto al grupo control.

EL CasNa ESTIMULA LINFOPOYESIS B EXTRAMEDULAR

Existen evidencias de que la inflamación induce la mielopoyesis en MO a costa de la linfopoyesis, misma que se desplaza a un sitio extramedular (Ueda *et al* 2005). En nuestros ensayos encontramos que CasNa estimula un proceso inflamatorio, procedimos a analizar el efecto del CasNa sobre la linfopoyesis B. Previamente publicamos que el CasNa induce granulopoyesis en médula ósea (Vanihamin *et al* 2013), por lo que en este trabajo procedimos a confirmar la reducción de la linfopoyesis B en MO, para lo cual analizamos las células presentes en la MO mediante citometría de flujo empleando el antígeno B220 como marcador del linaje linfocitario y la incorporación de BrdU para detectar proliferación.

El análisis para determinar la presencia de células mononucleares y de células B220⁺/BrdU⁺ mostró mayor proporción en los ratones tratados con Vehículo que en los tratados con CasNa (Figura 26).

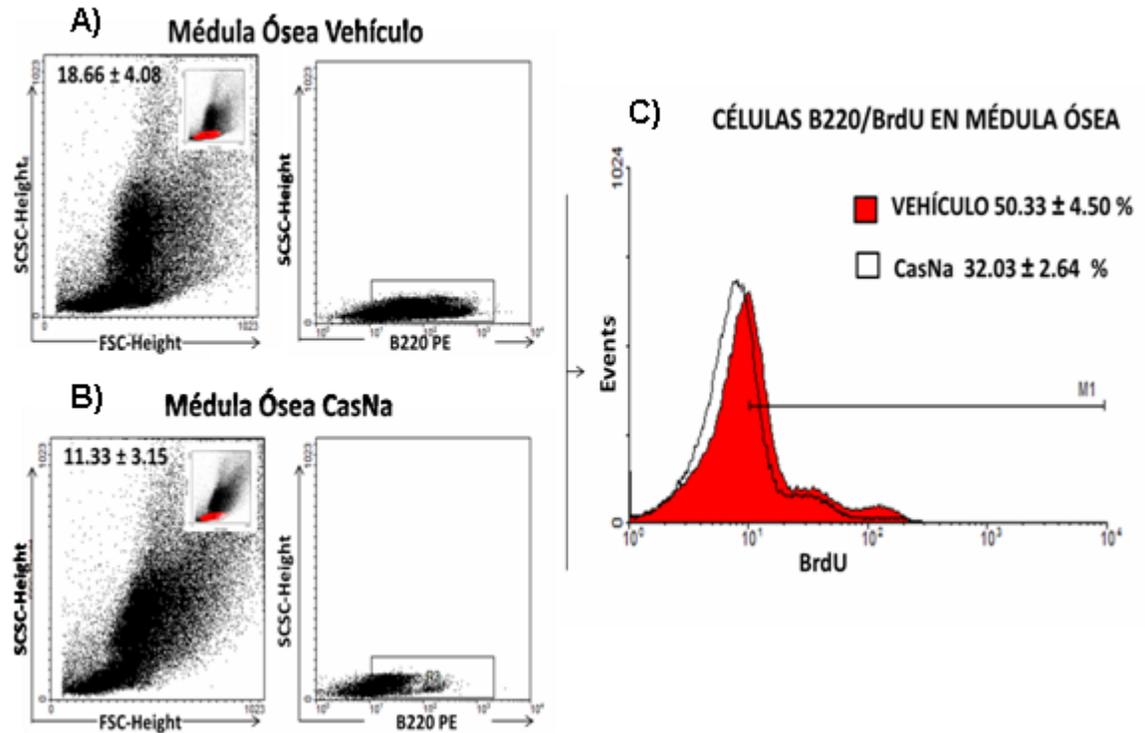


Figura 26.- El tratamiento IP con CasNa disminuye el porcentaje de células correspondientes al linaje linfóide en médula ósea así como la incorporación de BrdU. Se presentan dotplots representativos de células mononucleadas totales provenientes de ratones tratados con solo vehículo o CasNa. Selección mediante granularidad y tamaño de la región correspondiente al linaje linfóide (A) y positividad al anticuerpo anti B220 (B). Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células B220 positivas provenientes de ratones de CMN de médula ósea tratados o no con CasNa (C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células (de la marca M1) \pm DS. se llevo a cabo un análisis estadístico correspondiente a 3 experimentos realizados de manera independiente con una n de 3 ratones cada uno.

A continuación analizamos el efecto del CasNa sobre bazo, órgano donde se lleva a cabo la linfopoyesis B extramedular (Ueda et al 2004). Al extraer el bazo de los ratones pertenecientes a diferentes grupos, se observó incremento en el tamaño del bazo tanto en los individuos que recibieron CasNa como los que fueron tratados con Albúmina con respecto al grupo control (Figura 27).

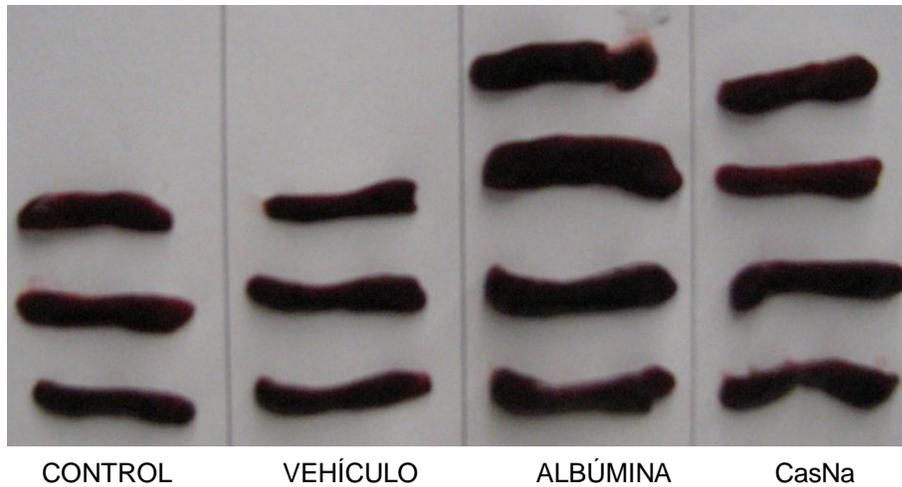


Figura 27. Fotografía que permite comparar el tamaño del bazo en ratones sin tratamiento (control) y de los que fueron tratados con vehículo, albúmina o CasNa.

El índice esplénico, confirma el incremento de los bazos proveniente de ratones tratados con CasNa y Albúmina con respecto a los ratones control y vehículo (Figura 28).

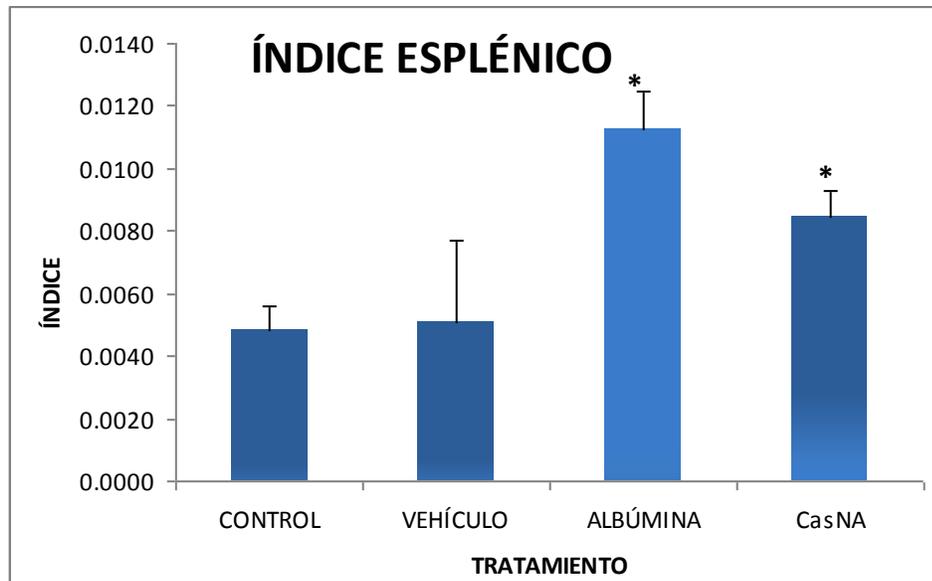


Figura 28. Índice esplénico de ratones: sin tratamiento (control) y los que fueron tratados con vehículo, albúmina o CasNa. *Significancia estadística con $\alpha = 0.05$ con respecto al grupo control.

El análisis por citometría de flujo en las células presentes en el bazo, se observó que la proporción de células B220⁺/BrdU⁺ positivas en los ratones tratados con vehículo es menor a los que recibieron CasNa (Figura 29).

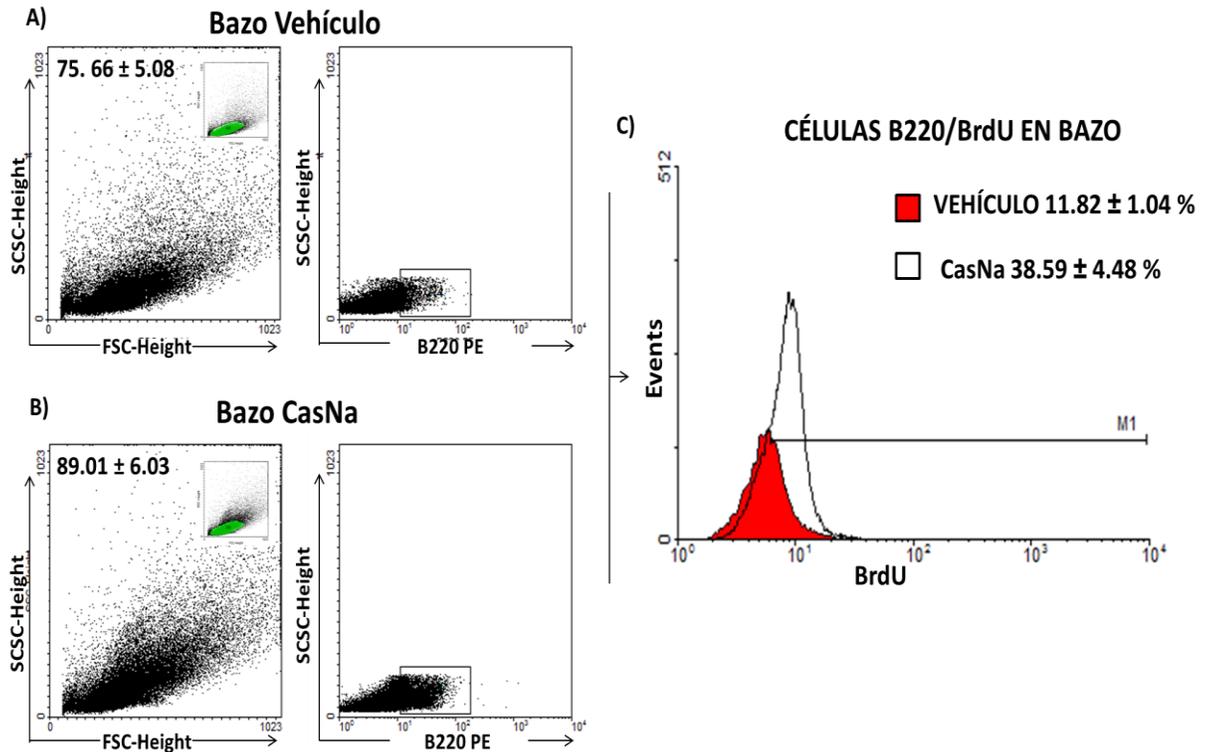


Figura 29.- El tratamiento IP con CasNa aumenta el porcentaje de células correspondientes al linaje linfocítico en Bazo así como la incorporación de BrdU. Se presentan dotPlots representativos de células mononucleadas totales provenientes de ratones tratados con solo vehículo o CasNa. Selección mediante granularidad y tamaño de la región correspondiente al linaje linfocítico (a) y tinción positiva al anticuerpo anti B220 (B). Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células B220 positivas provenientes de ratones de CMN de médula ósea tratados o no con CasNa (C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células \pm DS. El análisis estadístico corresponde al menos a 3 experimentos realizados de manera independiente con una N de 3 ratones cada uno.

EL CasNa ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T

En contraparte de la estimulación de mielopoyesis y linfopoyesis B inducida por la inflamación, también se ha observado que la inflamación inhibe la proliferación de linfocitos T y su diferenciación hacia CD4⁺ o CD8⁺ (Dunn *et. al*, 1997) e incluso en ocasiones extremas, como lo puede ser la inflamación crónica, llega a

generar timosupresión e involución del timo (Gruver *et al* 2008). Con la finalidad de analizar el efecto del CasNa sobre la proliferación de linfocitos T, se procedió a extirpar el Timo de los ratones de los diferentes grupos, al llevar acabo la inspección macroscópica de estos no se observó malformación en ninguno, tampoco diferencia en tamaño (Figura 30).

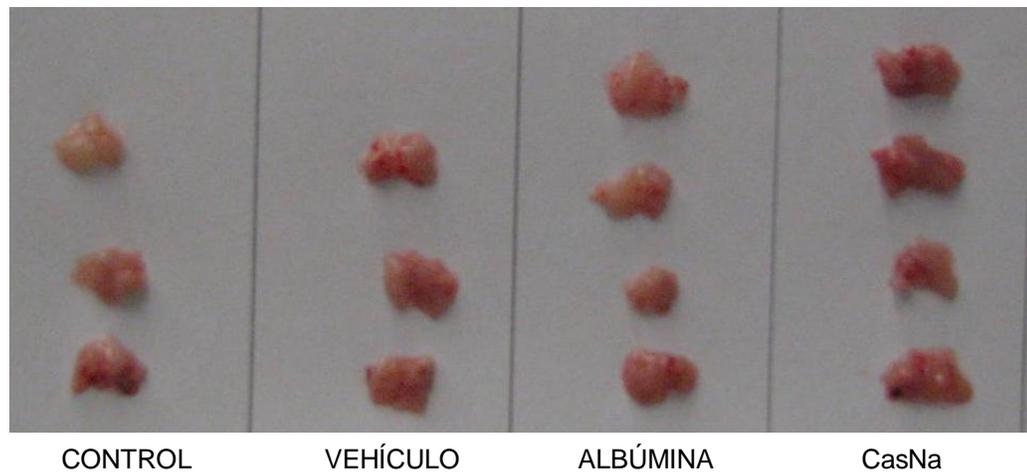


Figura 30. Comparativo de los timos extraído de ratones: sin tratamiento (control) y de los que fueron tratados con vehículo, albúmina ó CasNa, no se observa malformación en ningún timo ni aumento en el tamaño de los grupos que fueron tratados, con respecto a los del grupo control.

Se corroboró el tamaño mediante la determinación de los índices tímicos, en donde los datos mostraron que solo el tratamiento CasNa provocó incremento en el peso del timo en comparación al grupo control (Figura 31).

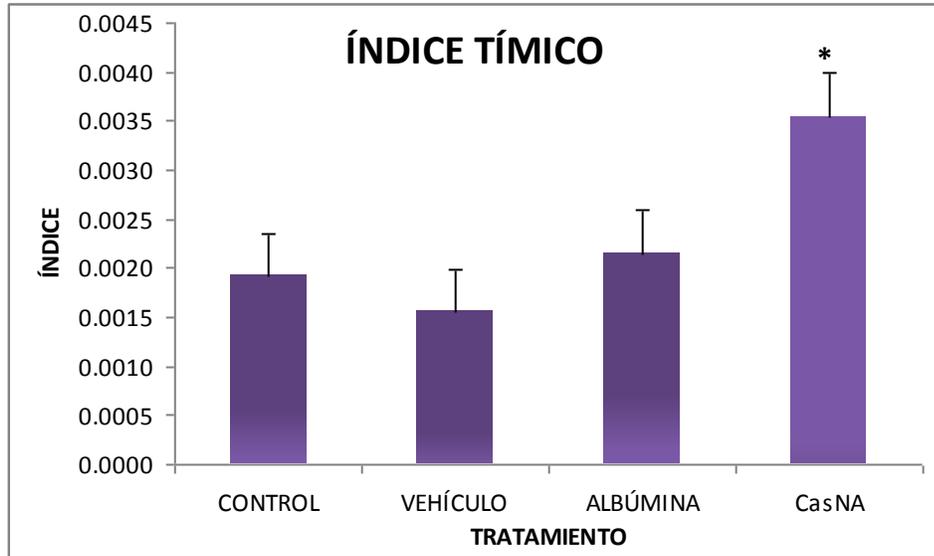


Figura 31. Índice tímico de ratones: sin tratamiento (control), de los que fueron tratados con vehículo, albúmina ó CasNa. *Significancia estadística con $\alpha = 0.05$ en comparación al grupo control.

Al coleccionar y evaluar el número de células totales en timo, únicamente se observó diferencia con significancia estadística en el número de timocitos presentes en los ratones que fueron tratados con CasNa respecto al grupo control (Figura 32).

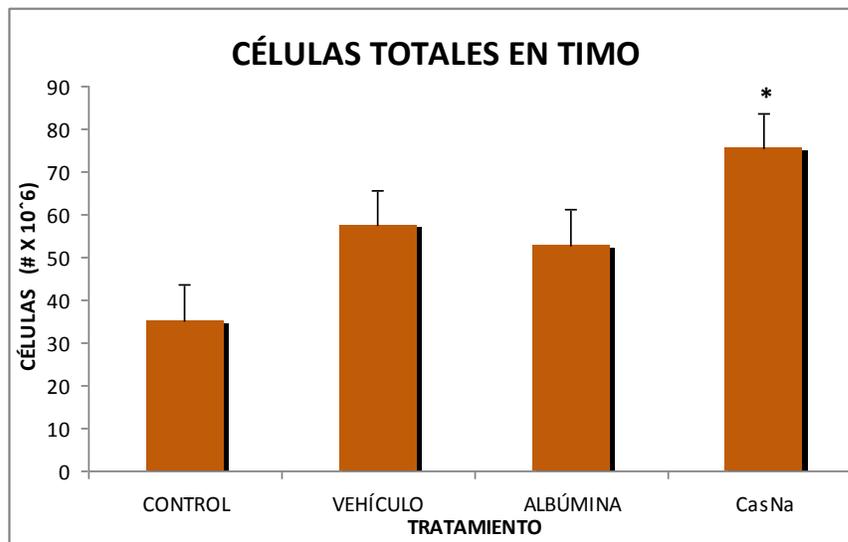


Figura 32. Cuento de células totales presentes en los timos de ratones: sin tratamiento (control) y de los que fueron tratados con vehículo, albúmina ó CasNa. Existe diferencia significativa del grupo tratado con CasNa con respecto al grupo control.

Se llevo acabo el análisis, por medio de citometría de la población de timocitos, para lo cual se utilizaron los marcadores CD8 y CD4 (eje “X” y eje “Y” respectivamente). Se observó incremento en la proporción de timocitos doble positivos CD4⁺/CD8⁺ en los ratones tratados con CasNa (Figura 33), estadio crítico en la maduración y diferenciación de linfocitos T que posteriormente conforman el repertorio periférico de células T CD4⁺ y CD8⁺, esenciales para el montar la respuestas inmunes (Wang et al 2011, Lee at al 2012,) así como incremento en células con incorporación de BrdU⁺, indicativo de proliferación.

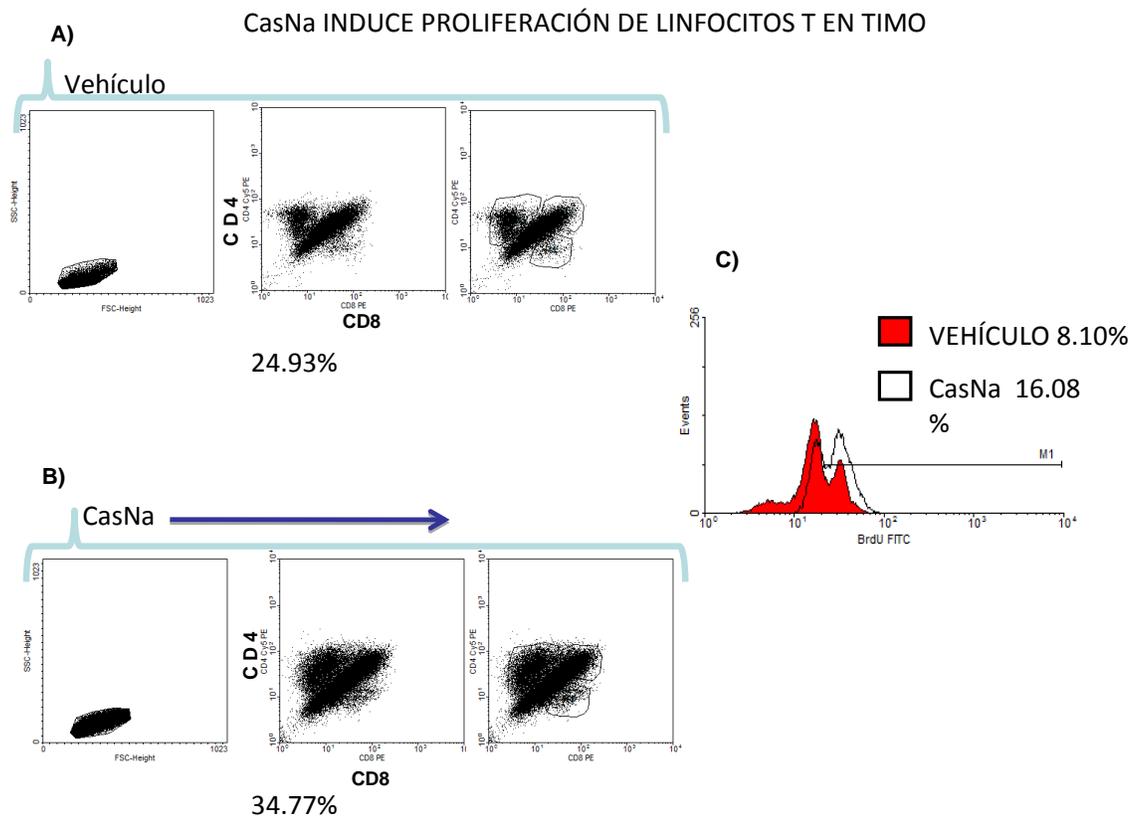


Figura 33. Se presentan dotplots representativos de células presentes en Timo de ratones tratados con vehículo (A) y CasNa (B), se emplearon los marcadores CD4 (eje “Y”) y CD8 (eje “X”). Se observa incremento de linfocitos CD4⁺/CD8⁺ de los ratones tratados con CasNa con respecto de los que recibieron únicamente vehículo, así como un incremento en la proporción de células BrdU⁺ (C) de los ratones tratados con CasNa.

EL CasNa ESTIMULA LA SECRECIÓN DE CITOCINAS ESCENCIALES PARA LA LINFOPOYESIS.

En experimentos *in vivo* se demostró que el CasNa o la caseína estimula el incremento en suero de M-CSF, G-CSF y GM-CSF (Lotem & Sachs 1985, Metcalf 1996) además de que existen evidencias *in vitro* de que estimulan la producción de citocinas Th1 prevaleciendo IL-2 (Mao *et al* 2005a, Mao *et al* 2005b, Mao *et al* 2006, Mao *et al* 2007). Por lo que nuestra siguiente incógnita era averiguar si el CasNa *In vivo* estimula la liberación de citocinas esenciales en la linfopoyesis. Durante la linfopoyesis la presencia de IL-7 es indispensable durante el proceso de maduración y diferenciación tanto en linfocitos B como en T. Por lo que procedimos a determinar su concentración en suero de ratones de los diferentes grupos. Los datos obtenidos mostraron incremento en la concentración de IL-7 en los ratones tratados con CasNa (Figura 34).

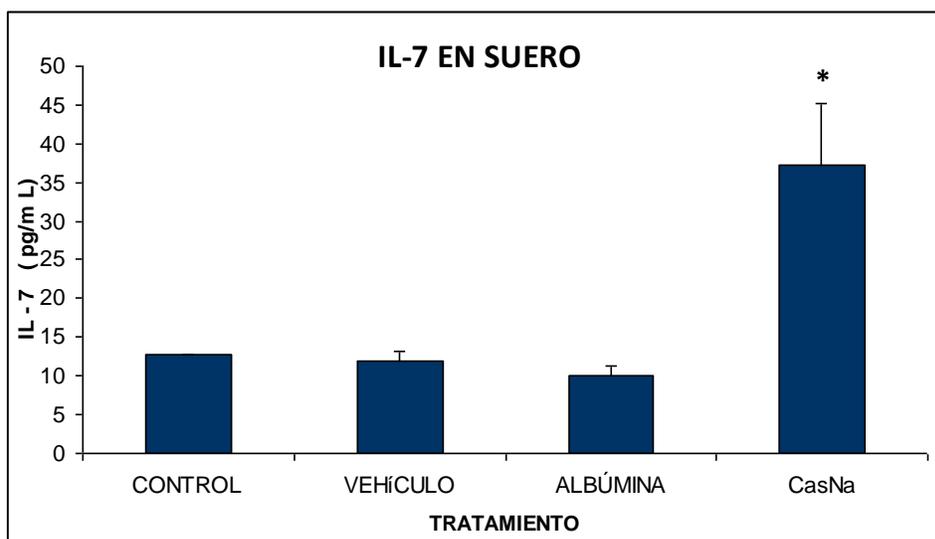


Figura 34. Determinación de la concentración en suero de IL-7 en los ratones sin tratamiento (control), que fueron tratados con vehículo, albúmina ó CasNa, *Significancia estadística $\alpha = 0.05$ con respecto al grupo control

En la diferenciación de los linfocitos en el timo hacia los linajes CD4 o CD8 el conjugado de IL-2 e IL-15 es fundamental, por lo que se cuantificó la concentración de estas citocinas en el suero ratones de los diferentes grupos. De los datos obtenidos en nuestro ensayo observamos que en aquellos individuos que recibieron CasNa o Albúmina la concentración de IL-2 en suero aumentó con relación al grupo control (Figura 35)

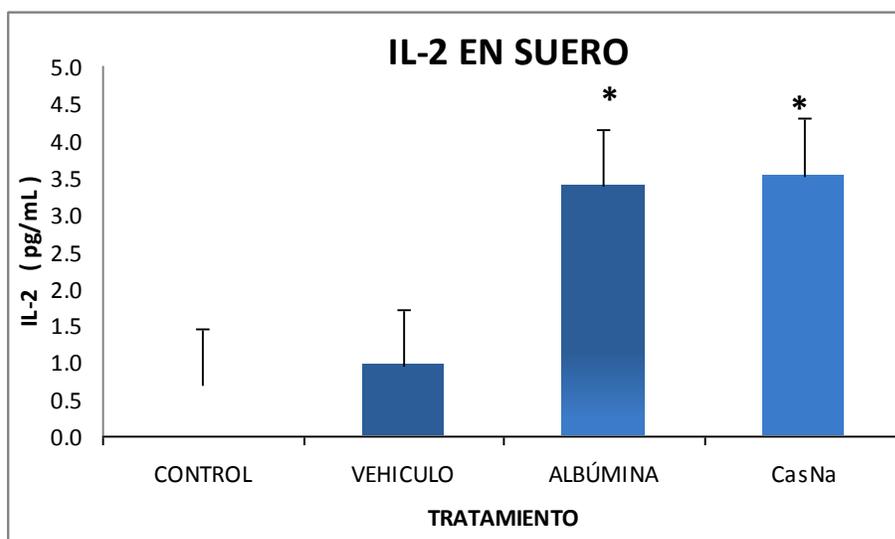


Figura 35. Determinación de la concentración en suero de IL-2 en ratones sin tratamiento (control), tratados con vehiculo, CasNa ó albúmina. *Significancia estadística $\alpha = 0.05$ co respecto al grupo control.

De los datos obtenidos en la determinación de IL-15 observamos no se detecto en los suero de los ratones control y en aquellos que recibieron algún tratamiento se incrementó, principalmente en aquellos que recibieron CasNa y albúmina (Figura 36).

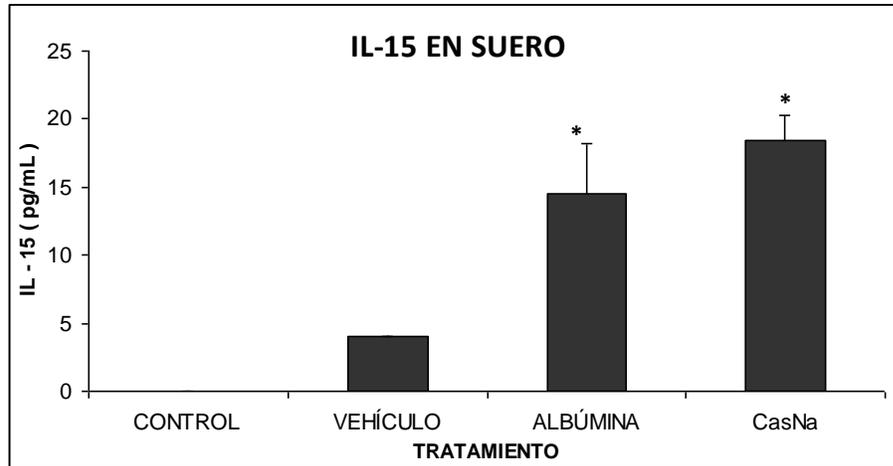


Figura 36. Determinación de la concentración en suero de IL-15 en ratones sin tratamiento (control) y tratados con vehículo, CasNa, albúmina. *Significancia estadística $\alpha = 0.05$ con respecto al grupo control.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En experimentos con ratones se ha determinado que la administración por vía oral de componentes de la caseína incrementa la actividad de los fagocitos de sangre periférica y cavidad peritoneal (Kazlauskaitė 2005). También se ha reportado que en ratones inoculados por vía intraperitoneal (IP) con caseína o una sal derivada de esta, el caseinato de sodio (CasNa), moviliza granulocitos y macrófagos al sitio de la inyección e induce incremento en las concentraciones en suero y exudado peritoneal de M-CSF, G-CSF y GM-CSF (Lotem & Sachs 1985, Metcalf 1996). Por otro lado, se sabe que la inflamación es un mecanismo de defensa perteneciente al sistema inmune innato, se presenta al generarse alguna alteración de la integridad tisular o cuando ingresan al cuerpo agentes antigénicos, como bacterias o levaduras, durante este proceso se generan cambios físicos, químicos y biológicos en el área afectada provocando acopio en el sitio de lesión de moléculas proinflamatorias, citocinas y células fagocíticas (macrófagos y/o polimorfonucleares), estas últimas al ser activadas y para eliminar al antígeno producen especies reactivas de oxígeno (ROS) además de algunas citocinas (Rojas-Espinoza et al 2006, Vega-Robledo 2008, Ramírez-Orellana 2008, Rojas et al 2009), motivo por el cual nos dimos a la tarea de examinar si los efectos observados por el tratamiento con CasNa *in vivo* pudieran estar asociados a un evento inflamatorio.

En este trabajo se muestra que el CasNa *in-vivo* es un potente quimioatrayente ya que se encontró mayor número de células en la cavidad peritoneal (CP) de los ratones tratados con CasNa que incluso en aquellos que fueron tratados con Tioglicolato (TIO), un proinflamatorio empleado tradicionalmente para movilizar células a la cavidad peritoneal (Brown et al 1984). Así nuestros datos concuerdan con el modelo *in vitro* donde se demuestra la capacidad de la β -caseína como potente quimioatrayente de monocitos y macrófagos (Laffineur et al 1996, Kitazawa et al 2007). También en nuestros experimentos se demuestra que las células provenientes de CP de ratones tratados con CasNa presentaron mayor producción de ROS, tanto en estado basal como en presencia

de levaduras, lo cual sugiere que las células están activadas. Observamos incremento el número de células formadoras de rosetas e incluso en la calidad de estas, dado que mientras se consideran como una roseta a la unión de 3 a 5 eritrocitos a una célula fagocítica, las rosetas formadas de los ratones tratados con CasNa, estaban compuestas por más de 8 eritrocitos, lo cual sugiere que el CasNa *in vivo* estimula un incremento en la expresión de receptores Fc, así estos datos concuerdan con el hecho de que CasNa induce la expresión de receptores Fc (Ramos *et al* 2000), receptores fundamentales para el reconocimiento y eliminación por inmunofagocitosis de agentes patógenos (Bournazos *et al* 2009). Estos datos nos ayudan a entender como la administración de caseína permite la sobrevivencia de ratones inoculados con dosis letales de bacterias (Noursadegh 2002),

La ceruloplasmina (Cp) es una proteína clasificada como molécula de respuesta inflamatoria de fase aguda (PFA) (Oliveiro 2006). Aquí se muestra que tanto en los ratones tratados con CasNa como con Albúmina se incremento en forma significativa la concentración en suero de ceruloplasmina. El hecho de que el CasNa incremente los niveles de Cp puede tener relevancia biológica ya que la Cp posee propiedades antioxidantes contra la peroxidación lipídica y oxidantes frente a varias aminos (Del Valle *et. al.*, 2002, Izquierdo *et. al.* 2009), incluso dado que la ceruloplasmina es un acarreador de hierro hacia la medula ósea se considera como agente precursor de la síntesis de hemoglobina (Unger & Chiappe 2008).

El Oxido Nítrico (NO) es un compuesto responsable de diversas funciones fisiológicas como: vasodilatación, relajación muscular, osteogenesis e incluso como neuromodulador, el NO es producido de manera natural por diversas células del cuerpo, principalmente macrófagos tisulares (Goroica *et al* 1999). Durante un proceso inflamatorio agudo (4 a 6 horas) se incrementa la liberación de NO en células polimorfonucleares, mientras que durante la inflamación crónica (semanas) es liberado por macrófagos activados, en dado caso puede llega a inducir alteraciones e incluso generar lesión tisular en el área donde se generó la inflamación (Paul-Clark 2002), por lo cual el NO es empleado como marcador de un

proceso inflamatorio, pero dado que es inestable y tiene una vida media muy corta se realizó la determinación de nitritos como método indirecto para detección de NO (Ramírez-Emiliano *et al* 2007). En nuestros ensayos no se observó diferencia significativa entre los grupos, sin embargo hay una tendencia de mayor liberación de NO en el grupo tratado con CasNa, lo cual podría ser benéfico ya que el NO induce la relajación del endotelio y músculo liso vascular. Asimismo ser catalogado como neuromodulador (Ferrer *et. al.*, 1998). Actualmente es contemplado para el tratamientos de diferentes trastornos vasculares como hipertensión pulmonar, insuficiencia cardiaca, aterosclerosis, disfunción eréctil, restenosis del músculo liso, shocks, para la prevención y tratamiento de lesión por isquemia, enfermedades neurodegenerativas e incluso como agente para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Ignarro 2005, Ignarro *et. al.* 2006, Fernandez *et al* 1999, Adan A & Prat 2005). Sería interesante evaluar en un futuro si la administración de CasNa promueve alguno de estos beneficios en la salud.

Se ha demostrado; que el CasNa induce un proceso inflamatorio, pero no se sabe si al emplear este tratamiento podría desencadenar una inflamación crónica. Por está razón se determinó el incremento en el peso del pellet que se implanto en los ratones de acuerdo al modelo previamente descrito (Marroquín-Segura *et al* 2009), los datos muestran que solo hubo diferencia estadística significativa, en el peso del pellet de los ratones tratados con vehículo con respecto al grupo control. Cabe destacar que en el caso de los ratones tratados con CasNa se denota menor peso del pellet con respecto al grupo control. Con estos resultados podemos aseverar que por el hecho de irrumpir la integridad del endotelio e introducir un volumen elevado de líquido, modificamos la homeostasis e inducimos un proceso inflamatorio, de acuerdo a nuestros resultados, en el caso del vehiculo desencadena una inflamación crónica. De acuerdo a lo anteriormente expuesto, durante el tratamiento con CasNa existe un evento inflamatorio de carácter agudo sin llegar a desencadenar una inflamación crónica, la cual puede generar lesiones en el organismo. Por otro lado, el CasNa podría estar funcionando como inmunomodulador, al inducir la expresión, de manera controlada, de citocinas y

metabolitos presentes en un proceso inflamatorio, que han demostrado generar múltiples beneficios en la homeostasis y la salud de los individuos, con lo que se incrementa la posibilidad de emplear el CasNa como potencial agente terapéutico para el tratamiento y prevención de diversos trastornos, como los cardiovasculares.

Existen reportes donde indican que la inflamación estimula la mielopoyesis en médula ósea pero provoca una disminución de la linfopoyesis, desplazándola a un sitio extramedular. (Ueda *et al* 2005), Concordando con lo anteriormente expuesto, el tratamiento con CasNa redujo la proporción de células B en la medula ósea que incorpora BrdU, pero interesantemente se incremento en el bazo (Figura 26), indicativo de una linfopoyesis en bazo (Ueda *et al* 2004). La hematopoyesis extramedular considerada un mecanismo compensador en pacientes con anemia crónica o por supresión medular postquimioterapia, para responder tanto a la demandas basales como las emergentes, con la formación de células hematopoyéticas en órganos que cumplieron está función en la vida fetal, como el bazo e hígado, se caracteriza principalmente por un incremento de tamaño en dichos órganos (Rosada *et. al.*, 2007, Naranjo *et. al.*, 2001). Al realizar la disección del bazo de los ratones de los diferentes grupos, observamos un incremento considerable en su tamaño, tanto en los ratones tratados con Albúmina como con CasNa, lo cual fue corroborado con la determinación del índice esplénico, garantizando así que el incremento del peso del bazo es por el tratamiento y no debido a una diferencia en el peso de los ratones. El hecho de que el CasNa active la linfopoyesis B en bazo, se suma a las evidencias de hematopoyesis estirpe eritroide y granulocito-macrófago, dado que fue allí donde se desarrollaron durante la etapa fetal, aunado al papel de almacenaje de células sanguíneas, maduración y/o destrucción de eritrocitos además de ser un punto de reconocimiento de antígenos y respuesta inmunológica tanto celular (macrófagos y polimorfonucleares) como humoral (linfocitos B) en la etapa adulta (Cesta 2006).

Por otro lado, se observó que la población de timocitos doble positivos (CD4⁺CD8⁺) provenientes de ratones tratados con CasNa, también incorporaron más BrdU que los controles, lo cual indica que estas células proliferan en presencia de CasNa, lo cual correlaciona con el incremento en el número de timocitos e índice tímico, evidencia de que existe inducción de linfopoyesis T. Estos datos se contraponen a las evidencias de que la inflamación inhibe la proliferación de linfocitos T y su diferenciación hacia CD4⁺ o CD8⁺ (Dunn *et. al*, 1997)

Para que se lleve a cabo la linfopoyesis es fundamental la liberación de citocinas como la interleucina 2 (IL-2), IL-7 e IL-15 (Rumfelt *et al* 2006, Averil *et al* 2006, Fry 2005). Para nuestra sorpresa el CasNa indujo un incremento en los niveles en suero de IL-7, IL-2 e IL-15, en suero aunque las dos últimas también se incrementaron en presencia de Albúmina. Estos datos refuerzan la idea de que el CasNa induce la linfopoyesis.

En síntesis, nuestros ensayos revelan que al administrar de CasNa *in vivo*, éste actúa como un agente pro-inflamatorio, induce la activación de células fagocíticas, estimula la liberación de marcadores de inflamación de fase aguda, como la ceruloplasmina, sin embargo no llega a desencadenar inflamación crónica, promueve la linfopoyesis B en bazo y de células T en timo, además provoca incremento en los niveles en suero de las citocinas IL-7, IL-2 e IL-5, básicas de la linfopoyesis. Este conjunto de datos indica que el CasNa es un agente proinflamatorio muy particular, ya que se conoce de otros estudios que no induce la producción de TNF o IL-1, lo cual nuestro grupo de trabajo lo ha confirmado, todo lo anterior aunado a que induce granulocitos funcionales después de estimular la granulopoyesis, vía G-CSF, por lo que es recomendable estudiar la posibilidad de que el CasNa pueda usarse como medida profiláctica en pacientes ocupacionalmente expuestos a agentes infecciosos.

CONCLUSIONES

- El CasNa es un pro-inflamatorio, su administración induce inflamación aguda
- El CasNa estimula la linfopoyesis extramedular en bazo y timo.
- El CasNa estimula la secreción de IL-7.
- La Albúmina y el CasNa, estimulan la liberación de IL-2 e IL-15.

PROSPECTIVAS

- Analizar si los linfocitos en bazo son Linfocitos B vírgenes ó de memoria como consecuencia de una respuesta inmune.
- Evaluar la estadios inmaduros de la linfopoyesis tanto B como T
- Analizar el efecto del CasNa en células NK

BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta-Rodríguez EV, Merino MC, Montes CL, Motrán CC, Gruppi A. Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine & growth factor reviews* 2007; 18: 73-83
- Adan Ana, Prat Gemma. Funciones y potencial terapéutico del óxido nítrico en el sistema nervioso central. *Psicothema* 2005; 17(2): 275-280
- AdarmesHector, Quezada Mauricio, Croxanto Aurnaldo, Müller Andrea y Galleguillos Marco. Determinación de nitritos en suero sanguíneo y líquido sinovial de articulación carpal equina con inflamación aguda y daño crónico reagudizado. *Av. Cs. Vet.* 2008; 23: 19-24
- Akashi KD, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000; 404: 193-197
- Alvarez FA, Abudara V, Morales FR. El óxido nítrico como neurotransmisor y neuromodulador. *Acta de fisiología* 1999; 5: 39-77
- Anderlini P, Champlin RE. Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. *Blood* 2008; 111: 1767-1772.
- Aspinall Richard. T cell development, ageing and interleukine-7. *Mechanisms of ageing and development* 2006; 127: 572-578
- Asselin-Paturel C and Trinchieru G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *JEM* 2005. 202; 4: 461-465
- Ausman LM, Gallina DL, Camitta BM, Flath LC, Hegsted DM. Acute erythroid hypoplasia in malnourished infant squirrel monkeys fed isolated soy protein. *Am J Clin Nut* 1977; 30: 1713-1720
- Averil Ma, Koka Rima, Burkett P. Diverse function of IL-2, IL-15 and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu rev immunol* 2006; 24: 657-679.
- Balasubramaniam A. Manivannan R. Paramaguru R. and Vijayakumar. Evaluation of Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of Stem Bark of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. Using Different Experimental Models. *Global Journal of Pharmacology* 2011; 5 (2): 67-72
- Barod Margaret H. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. *Experimental hematology* 2003; 31: 1160-1169
- Becker A. J. McCulloch E. A. & Till J. E. Cytological demonstration of the clonal nature spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963. 197: 452-454
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reily TJ, Hasselbelch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck Georgina, Harrison CN, Green AR. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; 112: 141-149

- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reily TJ, Hasselbelch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck Georgina, Harrison CN, Green AR. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008; 112: 141-149
- Bellautono I. Hematopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 607-620
- Bhardwal Nina. Harnessing the immune system to treat cancer. *The journal of clinical investigation* 2007; 117: 1130-1136
- Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature Reviews Immunology* 2007; 7: 633-643
- Cavallo MG, Fava D, Monettini L, Barone F, Pozzilli P. Cell mediated immune response to b-casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implicatin for disease pathogenesis. *Lancet* 1996; 348:926-928
- Cesta Mark F. Normal estructure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic phatology* 2006; 34: 455-465.
- Chang KT, Sěfc L, Psedák O, Vokurka M, Necas E. Early fetal liver readily repopulates B lymphogenesis in adult bone marrow. *Stem cells* 2005; 23: 230-239
- Chen CC, Grimbaldston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *PNAS* 2005; 102: 11408-11413
- Chen L, Gao Z, Zhu J, Rodgers G. Identification of CD13+CD63+ cells as common progenitor for erythroid and myeloid linages in human bone marrow. *Exp. Hematol* 2007; 35: 1047-1055.
- Chen X, Esplin BL, Garret KP, Welner RS, Webb CF, Kincade PW. Retinoids accelerate B lineage lymphoid differentiation. *The journal of immunology* 2008; 180: 138-145
- Chuan-Zhen Lu, Bao-Guo Xiao. Neuroprotection of G-CSF in cerebral ischemia. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12: 2869-2875
- Dong M, Blode GC. Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies. *Blood* 2006; 107: 4589-4596
- Duarte MJ. Espinosa LR, Díaz MS, Sánchez RG, Lee Eng CV, Mijangos CJ, Barragan GJ. Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas
- Dunn RJ, Luedeckker CJ, Haugen HS, Clegg CH, Farr AG. Thymic overexpression of CD40 ligand disrupts normal thymic epithelial organitation. *The journal of histochemistry & cytrochemistry* 1997; 45: 129-141
- Fenaux P, Chemience C, Degos L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acude promyelocytic leukemia. *Semen hematol* 2001; 138: 13-25

- Ferrandini E, Castillo M, López MB, Laencina J. Modelos estructurales de la micela de caseína. *An vet (Murcia)* 2006; 22: 5-18
- Ferrer DF, Jorge FC, Garcia RR, Martínez AP. Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *MEDISAN* 1998; 2(3): 45-43
- Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *Immunology* 2005; 174: 6571-6576
- Gattegno L, Migliore-Samour D, Saffar L, Jollés P. Enhancement of phagocytic activity of human monocytic-macrophagic cells by immunostimulating peptides from human casein. *Immunol let* 1988; 18: 27-31
- Ghosh N, Matsui W. Cancer stem cells in multiple myeloma. *Cancer let* 2009; 277: 1-12
- Gil D, Schrum AG, Alarcón B, Palmer Ed. T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes. *JEM* 2005; 201: 517-522
- Gil del Valle, L, Reyes AT, Sánchez GM y León Fernández OS. Terapia antioxidante en la infección de la inmunodeficiencia humana. *Acta Farm. Bonaerense* 2002; 21(4): 301-308
- Godin Isabelle And Cumano Ana. Of birds and mice: hematopoietic stem cell development. *Int. J. Dev. Biol* 2005; 49: 251-257
- Gruver AL, Sempoewki GD. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *Journal of leukocyte biology* 2008; 84: 915-923.
- Heinzl K, Benz C, Martins VC, Haidl ID, Bleul CC. Bone marrow-derived hematopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment. *The journal of immunology* 2007; 178: 858-868
- Hira T, Hara H, Toimita F, Aoyama Y. Casein binds to the cell membrane and induces intracellular calcium signal in the enteroendocrine cell: a brief communication. *Exp Biol Med* 2003; 228:850-854
- Hou YH, Srour EF, Ramsey H, Dahl R, Broxmeyer HE, Hroman R. Identification of human B-cell/myeloid common progenitor by the absence of CXCR4. *Blood* 2005; 105: 3488-3492
- Huff CA, Matsui W, Smith BD, Jones RJ. The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood* 2006; 107: 431-434
- Hughes A, Brock JH, Parrott DMV, Cockburn F. Effect of human colostrums and infant formula on the phagocytic activity of macrophages. I. resident and stimulated mouse peritoneal macrophages. *Clin exp immunol* 1985; 61: 169-175
- Hughes A, Brock JH, Parrott DMV, Cockburn F. The interacción of infant formula with macrophages: effect on phagocytic activity, relationship to expression of class II MHC antigen and survival of orally administered macrophages in neonatal gut. *Immunology* 1988; 64:

- Igarashi H, Medina KL, Yokota T, Rossi MaID, Sakaguchi N, Comp PC, Kincade PW. Early lymphoid progenitors in mouse and man are highly sensitive to glucocorticoids. *International immunology* 2005; 17(5): 501-511
- Ignarra Louis J, Balestrieri ML, Napoli C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. *Cardiovascular research* 2007; 73: 325-340
- Ignarro Louis J. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2005; 5(7): 595
- Izquierdo CA, Ruiz LC, Cordova JC, Cordova JM, Guerra LJ, Rodriguez DB, Arancibia SK. Oxidative stress and antioxidants in the spermatic conservation. *Revista complutense de ciencias veterinarias* 2009; 3(2): 01-38
- Jamieson CA, Triona H. Chronic myeloid leukemia stem cell. *American society of hematology* 2008: 436-442
- Kaur S, Kaur H, Sing PP. Induction of colony-stimulating factor by a 30-kDa secretory protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Eur cytokines netw* 2004; 15(4): 327-338
- Kaushansky K. The enigmatic megakaryocytes gradually reveals its secrets. *BioEssays*. 1999; 21: 353-360
- Kitazawa H, Yonezawa K, Thno M, Shimosato T, Kawai Y, Saito T, Wang JM. Enzymatic digestion of the milk protein β -casein releases potent chemotactic peptide(s) for monocytes and macrophages. *Int immunopharmacol* 2007; 7(9): 1150-1159
- Kreitman Robert J. Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *BioDrugs* 2009; 23: 1-13
- Krishnan B, Morgan G. Non-hodkin lymphoma secondary to cancer chemotherapy. *Cancer epidemiol biomarkers prev* 2007; 16(3): 377-380
- Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Weichzorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanism: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem cells* 2005; 23: 879-894
- Kuendged A, Gattermann N. Valproic acid for the treatment of myeloid malignancies. *Cancer* 2007; 110: 943-954
- Kuriakose Philip. Targeted therapy for hematologic malignancies. *Cancer control* 2005; 12: 82-90
- Laffineur E, Genetet N, Leonil J. Immunomodulatory activity of β -casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria. *J dairy sci* 1996; 79: 2112-2120

- Lai Anne Y, Kondo Motonari. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin immunol* 2008; 20: 207-212
- Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morce III HC. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *The journal of immunology* 1998; 160: 3861-3868.
- Laky K, Fowlke BJ. Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Curr opin immunol* 2008; 20: 197-202.
- Larsson J, Karlsson S. The role of smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 2005; 24: 5676-5692
- Li W, Johnson SA, Shelley William C, Ferkowicz M, Morrison P, Li Y and Yoder MC. Primary endothelial cells isolated from the yolk sac and para-aortic splanchnopleura support the expansion of adult marrow stem cells in vitro. *Blood* 2003. 102;13: 4345-4353
- Li Z, Yu T, Zhao P, Ma J. Immunotoxins and cancer therapy. *Cellular & molecular immunology* 2005; 2 (2): 106-112
- López-Guillermo A, Mercadal S. The clinical use of antibodies in hematological malignancies. *Annals of oncology* 2007; 18: ix51-ix57
- López-Hernandez MA, Ustarez-López M. Dosis altas de eritropoyetina β semanal en pacientes en remisión, que reciben quimioterapia; efecto en sus requerimientos transfusionales. *Med int México* 2008; 24(6): 375-380
- Lotem J, Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer* 1985; 35:93-100
- Machado PR, Araújo MI, Carvalho L, Carvalho EM. Immune response mechanism to infections. *An bras Dermatol* 2004; 79(6): 647-664
- Majeti R, Park C, Weissman L. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell stem cell* 2007: 635-645
- Mao XY, Nan QX, Li YH. Growth-inhibiting activity of casein and its hydrolysate to tumor cell. *Milchweissenschaft* 2006; 2: 127-130
- Mao XY, Nan QX, Lin YH, Ni JR. Effects of different casein-derived hydrolysates and their separated fractions of mouse cell immunity. *Milchweissenschaft* 2005a; 60: 10-14
- Mao XY, Ren FZ, Nan QX, Li YH Ni JR. Immunomodulating effects of casein hydrolysates on murine peritoneal macrophages. *Milchweissenschaft* 2005b; 60: 119-121
- Mao XY, Yang HY, Song JP, Li HY, Ren FZ. Effect of yak milk casein hydrolysate of Th1/Th2 cytokine production by murine spleen lymphocytes in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 638-642

- Marroquin-Segura R, Flores-Pimentel M, Carreón-Sánchez R, García-Burciaga MM, Mora-Guevara JL, Aguilar-Contreras A, Hernandez-Abad VJ. The effect of the aqueous extract of *Helietta parvifolia* A. Gray (Rutaceae) stem bark on carrageenan-induced paw oedema and granuloma tissue formation in mice. *Journal of ethnopharmacology* 2009; 124: 639-641
- Marshall CJ, Sinclair JC, Trasher AJ and Kinnon C. Bone marrow progenitor cell 4 modulates c-kit expression and differentiation potential in murine embryonic aorta-gonad-mesonephros haematopoiesis in vitro. *British journal of hematology* 2007; 139: 321-330.
- Mauro MJ, Maziarz RT. Stem cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia: when should it be used? *Mayo clin proc* 2006; 81(3): 404-416
- Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores Guzman P, Chávez-Gonzalez A. Hematopoiesis. *Cancerologia* 2007. 2: 95 – 107
- Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression; intelligent design. *Nature reviews immunology* 2007; 7: 144-154
- Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current pharmaceutical design* 2003; 9: 1289-1295
- Melo B. Modulación de la expresión del linaje monocito-macrofago (fcgammara, m-csf, gm-csf y sus receptores) en células mieloides tratadas con caseínas. Tesis de licenciatura, Facultad de ciencias UNAM. 2004.
- Metcalf D, Robb L, Ashley R, Dunn, Mifsud S, Di rego L. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *The American Society of Hematology* 1996;88:3756-3764
- Metcalf Donald. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem cells* 2007; 25: 2390-2395
- Migliore-Samour D, Floc'h F, Jolles P. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J dairy res* 1989; 56(3): 357-362
- Migliore-Samour D, Jolles P. Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn?. *Experientia* 1988; 44(3): 188-193
- Milde CD, Paige CJ. IL-7: A key regulator of B lymphopoiesis. *Seminars in immunology* 2006; 18: 20-30

- Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, Uike N, Niuro H, Takenaka K, Nagafuji K, Miyamoto T, Harada M, Takatsu K, Akashi K. Identification of the progenitor: revision of phenotypic definition of human common myeloid progenitor. *JEM* 2009; 206: 183-193.
- Morrison SJ and Weissman IL. The long term repopulation subset of hematopoietic stem cell is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunol* 1994: 661-663
- Nagasawa Takashi. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6: 107-116
- Nagathihalli S Nagaraj and Pran S Datta. Targeting the transforming growth factor- β signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19(1): 77-91
- Naranjo JP, Sotolongo BM, Perdomo PM, Matos RO. Hematopoyesis hepática en el ratón sometido a mielosupresión por quimioterapia y tratado con *Aloe barbadensis* Miller. *Revista cubana de medicina militar* 2001; 30(3): 172-175
- Newburger Peter E. Disorders of neutrophil number and function. *American society of hematology* 2006: 104-110
- Noursadeghi M, Bickerstaff M, Hebert J, Moyes D, Cohen J, Pepys M. Production of granulocyte colony-stimulation factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *The journal of immunology* 2002; 169: 913-919
- Okano M, Ohnota H, Sasaki R. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *Biochemical and molecular roles of nutrients* 1992; 122: 1376-1383
- Opferman JT. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell death and differentiation* 2008; 15: 234-242.
- Ortín M. Immunotherapy of hematological malignancies: what is new? *Annals of oncology* 2005; 16: ii53-ii62
- Oyen WJG, Bodel L, Giammarile F, Maecke HR, Tennvell J, Luster M, Brans B. Targeted therapy in nuclear medicine-current status and future prospects. *Annals of oncology* 2007; 18: 1782-1792
- Pang L, Weiss MJ, Poncz M. Megakaryocyte biology and related disorders. *J clin invest* 2005; 115: 3332-3338
- Pang L, Weiss MJ, Poncz M. Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin. Invest* 2005; 115: 3332-3338
- Passegué E, Jamieson CHM Ailes LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *PNA* 2003; 100: 11842-11849.

- Pelayo R, Weiner R, Perry SS, Huang J, Baba Y, Yokota T, Kincade PW. Lymphoid progenitors and primary routes to the immune system. *Curro pin immunol* 2005; 17: 100-107
- Pelichovska T, Chang KT, Sefc L, Savvulidi F, Broulik P, Necas P. The late-stage foetal liver microenviroment is essential for later sensivity of B-lymphopoiesis to suppression by oestrogens. *Folia biological* 2008; 54: 1256-129.
- Petit-Cocault L, Volle-Challier C, Fleury M, Péault B and Souyri M. Dual role of Mpl receptor during the establishment of definitivehematopoiesis. *Develelopment* 2007; 134: 3031-3040
- Ramirez-Emiliano J, Flores-Villavicencio LL, Segovia J, Arias-Negrete S. Participación del oxido nítrico durante el desarrollo del absceso hepático amebiano. *Medicina* 2007; 67(2): 167-176
- Ramos G, Santiago E, Martínez I, Manrique B, Weiss B. El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *rev Invest Clin* 2000; 52: 638-44
- Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernandez J, Zambrano I, Santiago E. Sodium caseinate induces the murine multipotent myeloid cell line 32D to express and secrete the macrophage colony stimulating factor (M-CSF). *Arch Med Res* 2004a; 35: 109-113
- Ramos G, Weiss B, Melo B, Córdova Y, Ledesma E, Muñoz L, Sánchez L, García a, Santiago-Osorio E. Alpha, beta and kappa casein inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Life Sciences* 2006
- Ramos G. efecto de la caseína y la casiomorfina en la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mieloides 32D y WEHI-3. Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias Biológicas, FES Zaragoza UNAM 2004
- Hill. J. E. & McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Res.* 1961; 14: 213-222
- Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J clin* 2009; 59: 171-191
- Yin Tong and Li Linheng. The stem cell niches in bone. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 1195-1201
- Zhang J. Niu C. Ye L. huang H. He X. Tong WG. Ross J. Haug J. Johnson T. Feng JQ. Harris S. Wiedemann LM. MishinaY. Li L. Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836-841
- Zhang M, Gopal AK. Radioimmunotherapy based conditioning regimens for stem cell transplantation. *Semin hematol* 2008; 45(2): 118-125