



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE HEMATOPOYESIS Y LEUCEMIA

**PRODUCCIÓN DIFERENCIAL DE CITOCINAS PROMOTORAS E INHIBIDORAS DE
LA PROLIFERACIÓN MIELOIDE EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE LA
LÍNEA CELULAR WEHI-3, CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN NORMAL Y
SUERO DE RATONES TRATADOS CON EXTRACTOS DE *Sechium spp.***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

GONZALEZ UGARTE ANA KAREN

DIRECTOR DE TESIS: Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

México, D. F. 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, UIDCC, en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ). FES-Zaragoza, UNAM. Bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio. Con el apoyo financiero del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF PICSA 10-156), el Grupo Interdisciplinario de Investigación de *Sechium edule* en México A.C. (GISEM) y el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA-SINAREFI). Apoyo de beca para Tesis de Titulación ICyTDF PICSA 10-156 y del Sistema Único de Beneficiarios de Educación Superior SUBES.

La presente investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio y la M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez, con la colaboración del grupo GISEM, especial agradecimiento al Dr. Jorge Cadena Iñiguez.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por brindarme su apoyo, paciencia, tiempo, guía, y darme la oportunidad de formar parte de su increíble grupo de trabajo.

A la M. en C. Itzen Aguíñiga Sánchez por brindarme su amistad, paciencia, conocimientos, pero sobre todo por su confianza al formarme en el área de la investigación y compartir su pasión por un recurso tan maravilloso como *huitzayotl*.

Al Dr. Edgar Ledesma Martínez por su amistad y compartir su valioso conocimiento siempre con una sonrisa.

Al M. en C. Rodrigo Anibal Mateos Nava y al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por su tiempo, paciencia y asertividad en las observaciones para enriquecer este trabajo.

Al Biol. Jose Luis Guzmán Santiago y a la Biol. María de los Angeles Galvan por todos sus consejos, animo, apoyo durante la carrera y por enseñarme que en todos puede haber un buen amigo.

A mis compañeros de laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, por todo su apoyo, paciencia y cariño, por ser mi familia del L8.

DEDICATORIA

A mi **padre** por ser el ángel más grande que tengo y que desde el cielo me cuida.

A mi **madre** por su amor, apoyo incondicional y sus incontables sacrificios, por que mis logros también son de ella.

A mi hermano **Aldo**, por su apoyo, cariño y que más que mi hermano es mi mejor amigo y a mi hermana **Lizeth** por el gran ejemplo de lucha. A ambos, por lo que me enseñan todos los días y no se aprende en los libros.

A mi abuelita **Sara** por sus cuidados, amor, y enseñarme que no hay adversidad infranqueable.

A mis mejores amigos **Jazmín** y **Jonathan**, quienes representan verdaderos amigos, confidentes y cómplices, por todo los momentos que hemos vivido y lo que nos faltan por vivir.

A **Luis MB**, por todo su amor, apoyo, cariño, y paciencia, también por el talento en la realización de las figuras en esta tesis.

A **Aide LG**, por convertirte en mi cómplice de travesuras, viajes y mal viajes, por todos los momentos increíbles y siempre tener un comentario divertido aun cuando el panorama no era el mejor, por tu cariño y hermosa amistad.

A mis amigos **César, Javier, Roberto, Jorge, Fabian, Omar, Froylan, Luis Ángel** y **Luis Antonio**, por siempre hacerme sonreír, por su apoyo y sincero cariño, por hacerme recordar que siempre hay un después.

A mis amigas **Brenda, Areli, Evelyn, Jessica, Lesli, Liliana** y **Araceli**, por su amistad incondicional, por todos esos momentos de risa y todo el ánimo en los momentos difíciles.

A mi **familia** por estar siempre a mi lado, por todo el apoyo y cariño, en especial a mi tía **Yolanda Ugarte** por ser incondicional.

Gracias

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HEMATOPOYESIS.....	2
<i>Células hematopoyéticas</i>	<i>2</i>
<i>Regulación hematopoyética.....</i>	<i>6</i>
CITOCINAS.....	8
<i>Citocinas y hematopoyesis</i>	<i>8</i>
<i>Receptores de citocinas.....</i>	<i>14</i>
<i>Transducción de señales de las citocinas</i>	<i>17</i>
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)	19
INTERFERON GAMMA (INF-GAMMA).....	21
PROTEINA QUIMIOATRAYENTE DE MONOCITOS (MCP-1/CCL2)	22
INTERLEUCINA 6 (IL-6)	23
FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS-MACRÓFAGOS (GM-CSF)	25
FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITO (G-CSF)	27
FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE MACRÓFAGOS (M-CSF).....	29
HEMATOPOYESIS Y LEUCÉMIA.....	30
<i>Leucemia</i>	<i>31</i>
LAS PLANTAS COMO FUENTE DE PRINCIPIOS ACTIVOS	32
<i>Género <i>Sechium spp.</i>.....</i>	<i>33</i>
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
JUSTIFICACIÓN	38
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVOS.....	41
OBJETIVO GENERAL	41
OBJETIVOS PARTICULARES.....	41
MATERIAL Y MÉTODOS	42
<i>Preparación de los extractos</i>	<i>42</i>

<i>Cultivo de la línea celular WEHI-3</i>	42
<i>Obtención y cultivo de células mononucleadas de médula ósea (CMN-MO)</i>	43
<i>Evaluación de la proliferación celular</i>	43
<i>Obtención del sobrenadante de cultivos</i>	45
<i>Tratamiento de los ratones y obtención de suero</i>	45
<i>Detección de citocinas por CBAs</i>	46
<i>Detección de citocinas por ELISA</i>	47
<i>Manejo de datos</i>	48
RESULTADOS	49
EFFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS DE <i>SECHIUM</i> SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR LEUCÉMICA MIELOMONOCÍTICA DE RATÓN WEHI-3 Y CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN NORMAL	49
EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE <i>SECHIUM</i> EN LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	54
EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE <i>SECHIUM</i> EN LA ALTERACIÓN DE CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA MIELOPOYESIS	57
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS	71
APÉNDICE I	96
APÉNDICE II	99

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Citocinas y Hematopoyesis	10
Tabla 2. Valores de IC ₅₀	53
Tabla 3. Niveles de TNF- α	55
Tabla 4. Niveles de INF- γ	55
Tabla 5. Niveles de MCP-1.....	56
Tabla 6. Niveles de IL-6	57
Tabla 7. Niveles de GM-CSF.....	58
Tabla 8. Niveles de G-CSF	58
Tabla 9. Niveles de M-CSF	59

FIGURAS

Figura 1. Modelo de la hematopoyesis. Ilustra los sitios de actividad de los factores estimuladores de colonias e interleucinas (Tomado y modificado de Schering Plough-SANDOZ)..... 5

Figura 2. El microambiente hematopoyético está compuesto por diferentes tipos celulares como lo son: osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos y macrófagos, en conjunto estas células inducen una producción de citocinas hematopoyéticas que regulan diversas funciones en la célula (proliferación, diferenciación, maduración, etc) (1), dentro de este microambiente existe una interacción entre las moléculas de la matriz extracelular con las diferentes células y las citocinas para que éstas puedan regular diferentes funciones en la célula como la migración, proliferación, activación, etc. (2), las células hematopoyéticas interactúan con las células del estroma dando así origen al nicho hematopoyético (3). 7

Figura 3. Características estructurales de las diferentes familias de los receptores de las citocinas hematopoyéticas. Las familias de los receptores está compuesta principalmente por la familia de los receptores tipo 1 (GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, HGF y prolactina, principalmente); la familia de los receptores tipo 2 (INF α , β y γ , así

como la IL-10); familia de receptores con dominio tipo inmunoglobulina (G-CSF, principalmente); la cuarta familia es la del receptor del factor de necrosis tumoral (NGF, CD40 y el TNF principalmente); la quinta familia corresponde a la de los receptores con 7 dominios transmembranales (quimiocinas); una última familia que incluye a los receptores tipo tirosina cinasa (M-CSF, SCF e IL-1). 16

Figura 4. Morfología de los frutos de especies del género *Sechium* 35

Figura 5. Efecto antiproliferativo inducido por el extracto de *S. compositum*, sobre la línea celular WEHI-3 y CMN-MO. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo (0), 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, y 5 µg/mL de extracto. Se incluye Ara-C (1.2 µg/mL) como control de inhibición de la proliferación. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. *Diferencia significativa contra su respectivo control (ANOVA Tukey $p < 0.05$). 50

Figura 6. Efecto antiproliferativo inducido por el extracto de *S. chinantlense*, sobre la línea celular WEHI-3 y CMN-MO. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo (0), 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, y 5 µg/mL de extracto. Se incluye Ara-c (1.2 µg/mL) como control de inhibición de la proliferación. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. *Diferencia significativa contra su respectivo control (ANOVA Tukey $p < 0.05$). 51

Figura 7. Efecto antiproliferativo inducido por el extracto de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, sobre la línea celular WEHI-3 y CMN-MO. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo (0), 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, y 5 µg/mL de extracto. Se incluye Ara-c (1.2 µg/mL) como control de inhibición de la proliferación. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. *Diferencia significativa contra su respectivo control (ANOVA Tukey $p < 0.05$). 52

ABREVIATURAS

Aa Aminoácidos

ADN Ácido desoxirribonucleico

AMPc Adenosin monofosfato cíclico

Ara-C[®] Citarabina

ATCC American Type Culture Collection

Balb/c Cepa de ratón Balb/c

c-kit Receptor de SCF

Ca Calcio

Caspasas Cisteinil-aspartato proteasas

CD Cluster de diferenciación/antígenos de superficie celular

Cell Células

CFU Unidad formadora de colonias/progenitor

CFU-Ba Unidad formadora de colonias de basófilos

CFU-Dc Unidad formadora de colonias de células dentríticas

CFU-E Unidades formadoras de colonias de eritrocitos

CFU-Eo Unidades formadoras de colonias de eosinófilos

CFU-G Unidades formadoras de colonias de granulocitos

CFU-GM Unidades formadoras de granulocitos-macrófagos

CFU-MK Unidades formadoras de colonias de megacariocitos

CFU-preB Unidades formadoras de colonias de células B

CLP Progenitor linfoide común

CMN Cultivo de Células Mononucleadas de Médula Ósea

CMP Progenitor mieloide común

CO₂ Dióxido de carbono

CSA Actividad estimuladora de colonias

CSF Factor estimulador de colonia

DNA Ácido desoxirribonucleico

EUA Estados Unidos de América

FITC Isotiocianato de fluoresceína

FLT3 Tirosina cinasa relacionada a fms

G-CSF Factor estimulador de colonias de granulocitos

GISEM Grupo interdisciplinario de investigación en *sechium edule* en México

GM-CSF Factor Estimulador de colonias de granulocito-macrófago

HSC Célula hematopoyética troncal

HGF Factor de crecimiento hepatocitario

IC₅₀ Concentración de inhibición media

IL Interleucina

IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Medium

JAK Tirosina Janus Cinasa

J774 línea celular macrofágica

kb Kilobases

kDa Kilodaltones

L-929 Línea celular de fibrosarcoma de pulmón

LMA Leucemia mieloide aguda

LPS Lipopolisacárido bacteriano

LT-HSC Célula hematopoyética troncal reconstituyente a largo plazo

M Molar

MAPK Proteína cinasa activada por mitógenos

MCP/1 CCL2 Proteína quimioatrayente de monocitos 1

M-CSF Factor estimulador de colonias de macrófago

Mg Miligramos

mL Mililitros

MPP Progenitores multipotenciales

mRNA Ácido ribonucleico mensajero

NF-KB Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK Célula NK

NGF Factor de crecimiento nervioso

P388 Línea celular macrofágica

p53 Proteína anti-oncogénica, supresora de tumores

PBS Solución amortiguadora de fosfatos

PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas

pH Potencial de hidrogeno

S. Sechium

SFB Suero fetal bovino

ST-HSC Célula hematopoyética troncal reconstituyente a corto plazo

STAT Señal transductora de activación de tirosinas.

TGF-β Factor de crecimiento tumoral beta

TNF Factor de necrosis tumoral

TNF-α Factor de necrosis tumoral- alfa

TNF-R Factor receptor de necrosis tumoral

μL Microlitros

μg Microgramos

WEHI-3 Línea celular mielomonocítica

RESUMEN

A pesar del avance en el desarrollo de las nuevas terapias para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA), aún no se ha logrado incidir en la tasa de sobrevivencia y remisión de la enfermedad, por ello sigue vigente la búsqueda de alternativas terapéuticas particularmente de aquellas que promuevan la eliminación de células leucémicas sin dañar a las normales. En el presente trabajo se muestra que los extractos crudos de *S. compositum*, *S. chinantlense* y *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, tienen actividad antiproliferativa *in vitro* afectando drásticamente a las células leucémicas WEHI-3, sin afectar de la misma manera a las células de médula ósea de ratón. Para explorar la razón de este efecto diferencial, se evaluaron los niveles de citocinas involucradas en los procesos de inhibición de la proliferación y apoptosis, así como estimuladoras de la hematopoyesis, en sobrenadantes de cultivos de la línea celular WEHI-3, células de médula ósea de ratón normal y suero de ratones tratados con los extractos. Se encontró que los extractos de *Sechium*, inducen la expresión de citocinas como TNF- α y MCP-1, que son fuertes candidatos para explicar la inhibición de la proliferación y muerte de las células leucémicas *in vitro*, de manera interesante, cultivos de células hematopoyéticas normales en presencia de extractos de *Sechium* expresan GM-CSF pero no TNF- α mientras que *in vivo*, se encontraron altos niveles de citocinas promotoras de la hematopoyesis como el G-CSF y M-CSF, lo cual podría indicar además de inducción de la hematopoyesis, también actividad inmunoestimulante.

INTRODUCCIÓN

HEMATOPOYESIS

Células hematopoyéticas

Día a día el organismo debe reemplazar millones de células sanguíneas maduras para su correcto funcionamiento, ya sea para que este lleve a cabo el transporte de oxígeno, algún evento de coagulación, o bien la defensa del organismo (**Bellantuono, 2004**). Las células sanguíneas derivan de un tipo de células llamadas troncales hematopoyéticas (HSC *Hematopoietic Stem Cells*, por sus siglas en inglés), en un proceso de compromiso de linaje, proliferación y diferenciación celular conocido como hematopoyesis. La hematopoyesis es un proceso que se lleva a cabo únicamente en órganos hematopoyéticos (**Yin y Li, 2006**). Este proceso se inicia desde la embriogénesis en el saco vitelino, hígado, bazo y continúa durante la vida adulta en la médula ósea (**Zambrano et al., 1999**). Durante la etapa adulta del individuo y debido al incremento de las células adiposas en ciertas regiones de la médula, el proceso queda restringido fundamentalmente a la epífisis de los huesos largos (fémur y húmero), así como en los huesos pélvicos, columna vertebral, cráneo y esternón (**Hughes et al., 1991; Bellantuono, 2004**).

Las HSC son células muy primitivas, con capacidad de autorenovación, constituyen el 0.005-0.01% (1 HSC por cada $1-2 \times 10^4$ células) y residen principalmente en la médula ósea (**Thomas et al., 1999**). En su mayoría se encuentran en la fase G0 del ciclo celular (quiescentes) y se dividen solo para mantener el estado normal de la hematopoyesis o dependiendo de la demanda de progenitores en el organismo, ciclan muy lentamente, alrededor de 30 días en condiciones normales en la médula ósea de ratón (**Cheshier et al., 1999**).

La hematopoyesis se ha podido esquematizar en forma de cascada (Figura 1), en donde las células troncales hematopoyéticas la encabezan (**Szilvassy y Hoffman, 1995; Bellantuono, 2004; Mayani et al., 2007**). Debido a su potencial de reconstitución las HSC pueden ser

divididas en: células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo (LT-HSC por sus siglas en inglés, *Long-Term Hematopoietic Stem Cells*), capaces de autorenovarse indefinidamente durante toda la vida; y células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a corto plazo (ST-HSC por sus siglas en inglés, *Short-Term Hematopoietic Stem Cells*) que solo pueden autorenovarse durante un intervalo definido de tiempo, alrededor de 4-8 semanas (**Weissman, 2000a; 2000b**), son derivadas de las LT-HSC y son las que dan origen a los progenitores multipotenciales (MPP, del inglés *Multi-Potent Progenitor*), los cuales tienen como característica, el perder la capacidad de autorenovación, pero a cambio ganan un alto grado de proliferación y diferenciación (**Metcalf, 2008**). A partir de estos progenitores multipotenciales se derivan los progenitores que se comprometen ya sea hacia el linaje linfoide (CLP, del inglés *Commun Lymphoid Progenitor*) que darán origen a los linfocitos T, B y NK (**Kondo et al., 2001; Baba et al., 2004**) y por otro lado están los progenitores mieloides comunes (CMP, del inglés *Commun Myeloid Progenitor*), de los que se derivan los granulocitos, los monocitos, así como los megacariocitos y los eritrocitos (**Metcalf, 2008**). En cuanto al origen de las células dentríticas se ha observado que estas pueden ser derivadas tanto de los progenitores linfoides comunes como de los progenitores mieloides (**Mayani et al., 2007**).

De los CLP y los CMP se originan las etapas celulares intermedias, que son los precursores y las células hematopoyéticas maduras del torrente sanguíneo (**Mayani et al., 2007**). Las células comprometidas hacia determinado linaje también conocidas como unidades formadoras de colonias (CFU, del inglés *Colony Forming Unit*) y que son derivadas de los CMP y CLP pueden ser de granulocitos (CFU-G), eritrocitos (CFU-E), megacariocitos (CFU-MK), granulocito-macrófagos (CFU-GM), células B (CFU-preB), basófilos (CFU-Ba), eosinófilos (CFU-Eo) y células dentríticas (CFU-Dc) (**Kondo et al., 1997; Akashi et al., 2000a; 2000b**). Estas CFU's son las que dan origen a los precursores de las células maduras y es en estas etapas finales cuando los precursores así como las células maduras pueden ser identificados a simple vista al microscopio (**Mayani et al., 2007**).

Las células troncales hematopoyéticas, ya sean las LT-HSC, o las ST-HSC, así como los MPP, los CLP o CMP, no pueden ser identificadas morfológicamente bajo el microscopio, sin

embargo, éstas pueden ser identificadas mediante antígenos específicos de cada población, lo cual es conocido como inmunofenotipo. El inmunofenotipo puede ser evaluado por microscopía de epifluorescencia o citometría de flujo, debido a que existen inmunofenotipos específicos para cada tipo y linaje celular tanto para ratón como para humano (**Spangrude *et al.*, 1988; Bellantuono, 2004; Támok *et al.*, 2010**).

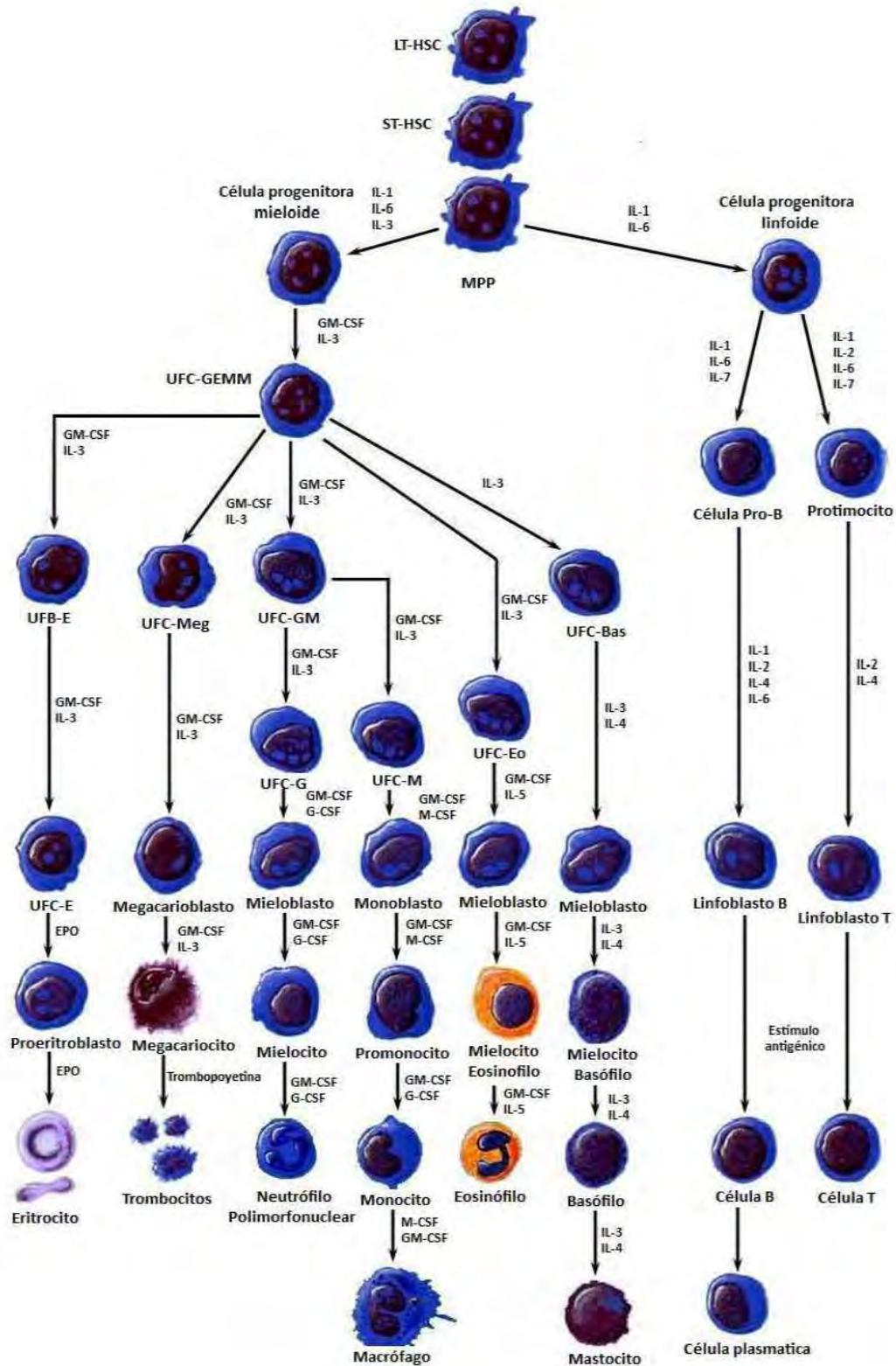


Figura 1. Modelo de la hematopoyesis. Ilustra los sitios de actividad de los factores estimuladores de colonias e interleucinas (Tomado y modificado de Schering Plough-SANDOZ)

Regulación hematopoyética

La regulación de las HSC es gobernada por dos entidades íntimamente relacionadas. Una es la expresión de genes y la otra es la composición de señales externas del microambiente de la médula ósea. Los factores de transcripción que regulan la expresión de genes, junto con señales externas provenientes del microambiente de la médula ósea pueden ser mediadas, ya sea por interacciones célula-célula, matriz extracelular-célula y por factores solubles llamados factores de crecimiento o citocinas (**Arai *et al.*, 2009**). Estos elementos en conjunto proveen un sistema de soporte estructural y funcional denominado microambiente hematopoyético (Figura 2), este es el lugar donde se lleva a cabo la hematopoyesis. El desarrollo de las células troncales dentro de la cavidad ósea es mantenido por muchas células maduras. El nicho osteoblástico donde interaccionan las HSC, consta de células en diferentes estadios incluyendo preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos así también fibras de colágeno (**Domínguez, 2012**).

Por su parte, las células que constituyen el microambiente hematopoyético son las células estromales como fibroblastos, precursores osteogénicos, adipocitos, macrófagos y células endoteliales, que en conjunto producen una compleja trama de moléculas de matriz extracelular y citocinas. Las primeras consisten de: proteoglicanos, heparán, condroitina, dermatán, colágeno, fibronectina, hemonectina, laminina y ácido hialurónico (**Verfaillie *et al.*, 1994; Klein, 1995**) siendo su principal función la de proveer el microambiente propicio para favorecer la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Por su parte las citocinas, el segundo tipo de proteínas dentro del microambiente hematopoyético; regulan la fisiología de las células hematopoyéticas y sus precursores (**Giles *et al.*, 2002; Munker *et al.*, 2007**) a través de receptores específicos, los cuales transmiten una serie de señales intracelulares que dan la información necesaria para sobrevivir o morir, proliferar o diferenciarse, o en el caso de las células troncales autorenovarse o permanecer quiescentes (**Broxmeyer *et al.*, 2001**).

MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO

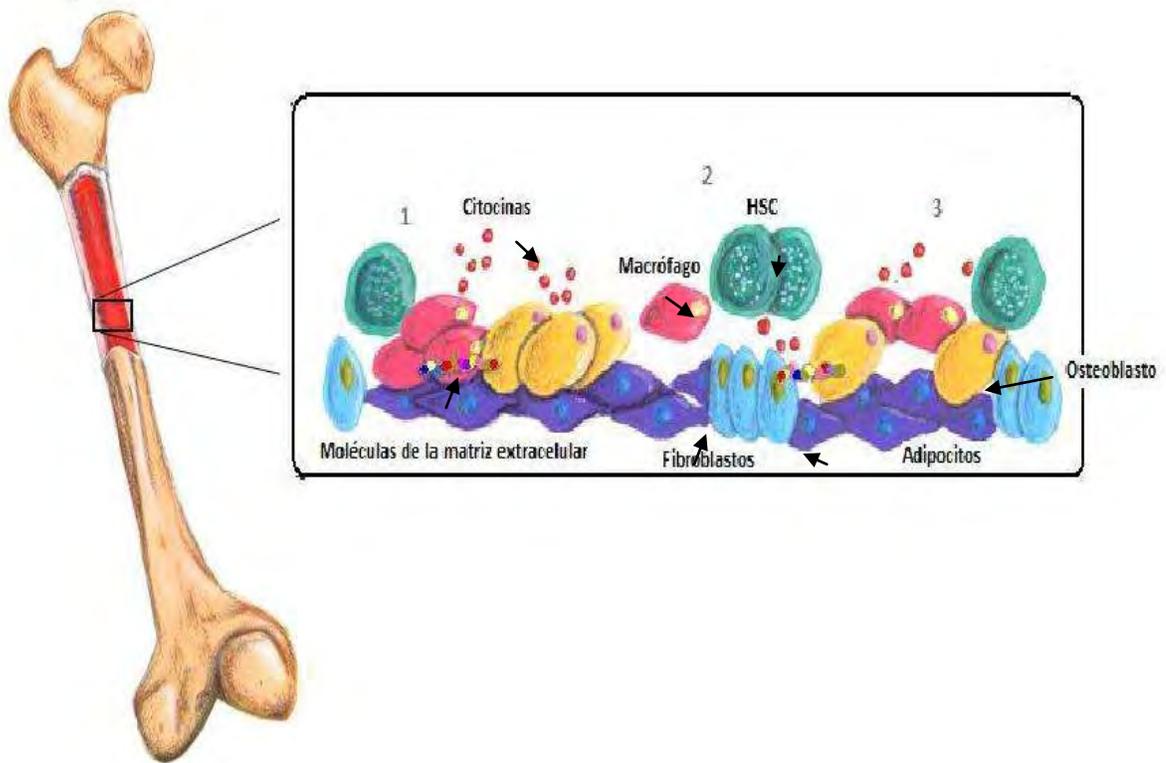


Figura 2. El microambiente hematopoyético está compuesto por diferentes tipos celulares como lo son: osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos y macrófagos, en conjunto estas células inducen una producción de citocinas hematopoyéticas que regulan diversas funciones en la célula (proliferación, diferenciación, maduración, etc) (1), dentro de este microambiente existe una interacción entre las moléculas de la matriz extracelular con las diferentes células y las citocinas para que éstas puedan regular diferentes funciones en la célula como la migración, proliferación, activación, etc. (2), las células hematopoyéticas interactúan con las células del estroma dando así origen al nicho hematopoyético (3).

CITOCINAS

Citocinas y hematopoyesis

El control de la hematopoyesis como ya se ha mencionado es regulado por una serie de glicoproteínas de bajo peso molecular (menos de 32kDa) llamadas citocinas, las cuales se encuentran en el microambiente hematopoyético (**Metcalf, 2008**). Entre las citocinas producidas por las células del microambiente, existen algunas que actúan predominantemente como estimuladoras de la hematopoyesis, otras en cambio, actúan como inhibidoras de ese proceso. En condiciones normales, existe un balance entre las citocinas estimuladoras e inhibidoras, lo que da como resultado la producción controlada de las células sanguíneas (**Dorantes, 2009**). Actualmente se reconocen más de 30 citocinas hematopoyéticas que se encargan de regular tanto de manera positiva como negativa la sobrevivencia, proliferación, diferenciación y muerte de las células hematopoyéticas (**Mayani et al., 2003**) (Tabla 1).

Las citocinas son moléculas de naturaleza proteica que actúan a través de la unión a receptores específicos de membrana activando una gran variedad de rutas de señalización implicadas en la proliferación, maduración, autorenovación o muerte celular. Por su efecto biológico y características moleculares se han dividido en: factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias (CSF), interferones, interleucinas (ILs) y quimiocinas (**Davis et al., 1996; Aguirre et al., 2002**). Estas moléculas presentan retro-regulaciones positivas y negativas entre sí y por lo general no actúan solas sino con otras citocinas producidas por la misma célula pudiendo inducir, potenciar (sinergizar) o inhibir la producción de citocinas y modular negativa o positivamente los efectos de las mismas (**Sachs, 1996**). Por otra parte, al actuar sobre diferentes tipos celulares pueden ejercer múltiples efectos (pleiotrópicos) e igualmente compartir muchos de ellos (redundantes) (**Aguirre et al., 2002**).

Pueden ser producidas por una gran variedad de células en diversos lugares del organismo, ya sea de forma constitutiva o después de la estimulación celular, son muy específicas y actúan a baja concentración, estos moduladores ejercen su actividad de manera autócrina, parácrina o endócrina. Además de estar implicadas en la hematopoyesis, son las

responsables de procesos que incluyen el reclutamiento y activación celular, modulación de la respuesta inmune, la inflamación, regulación tisular, angiogénesis y la expresión de moléculas de adhesión entre otros, actúan sobre la célula diana gracias a su afinidad por los receptores de membrana ejerciendo acción local, sin embargo las de mayor importancia actúan a nivel sistémico con efectos pleiotrópicos (**Hao et al., 1996; Carson y Vignali, 1999; Velázquez et al., 2001; Martins et al., 2002; Aguirre et al., 2002; Borish y Steinke, 2003**).

Cultivos *in vitro* del tejido hematopoyético a largo plazo han permitido establecer que la hematopoyesis se sostiene debido a que las células del estroma secretan diversas citocinas tal es el caso de las interleucinas: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-10, IL-13, entre otras; así mismo secretan diferentes factores estimuladores de colonias, los cuales han sido estudiados durante los últimos 30 años y contribuyen esencialmente al desarrollo de los 8 linajes celulares hematopoyéticos (**Laiosa et al., 2006; Metcalf, 2008**). Estos factores estimuladores incluyen al factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, del inglés *macrophage colony stimulator factor*), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, del inglés *granulocyte colony stimulator factor*), el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF, del inglés *granulocyte and macrophage colony stimulator*), el factor estimulador de colonias tallo (SCF, del inglés *stem cell factor*), factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumoral necrosis factor*), el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β , del inglés *tumoral growth factor beta*) y el factor estimulador de colonias múltiples, mejor conocido interleucina 3 (IL-3) (**Baker et al., 2007; Robb, 2007**). Estos factores tienen un amplio efecto en la función biológica de varios tejidos y células, entre los efectos más importantes de estos estimuladores celulares son que, intervienen en la supervivencia, proliferación, diferenciación de las células asimismo modulan también funciones celulares como son la quimiotaxis, degranulación, activación, adhesión, citotoxicidad, cambios fenotípicos y la expresión de mRNA de estas poblaciones celulares (**Metcalf, 2008**).

Aunque existen muchos tipos de células productoras de citocinas, dentro del microambiente hematopoyético son las células del estroma las que proporcionan una gran variedad de citocinas como lo son G-CSF, M-CSF, IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, TNF- α (**Ramakrishnan y Torok, 2010**); dentro del sistema inmune natural los macrófagos son las células más

comprometidas en la síntesis de citocinas mientras que en el sistema inmune específico las células T colaboradoras son las que se encargan de la producción de citocinas (**Hao *et al.*, 1996**).

Tabla 1. Citocinas y Hematopoyesis

CITOCINA (kDa)	ORIGEN	EFECTOS
FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS (CSF)		
GM-CSF (14-35)	Células T, endoteliales, macrófagos y fibroblastos.	Estimulación de proliferación y diferenciación de precursores mieloides, potencia las funciones de neutrófilos y monocitos maduros (lisis y fagocitosis).
G-CSF (18-22)	Monocitos-macrófagos, células endoteliales, células T, neutrófilos y fibroblastos.	Estimula la proliferación y diferenciación de granulocitos y neutrófilos.
M-CSF (70-90)	Monocitos, macrófagos, granulocitos, células endoteliales y fibroblastos.	Estimula la diferenciación de precursores hematopoyéticos hacia la línea monocítica. Funcionalidad de monocitos y macrófagos maduros.
Eritropoyetina (30)	Células intersticiales peritubulares renales, hígado y macrófagos de médula ósea.	Regula la producción de eritrocitos en condiciones normales y recuperación postanémica.
Trombopoyetina (18-70)	Hígado, riñón y músculo liso. En menor proporción en bazo.	Estimula la proliferación y diferenciación de las células progenitoras megacariocíticas. Aumenta la producción plaquetaria.
INTERLEUCINAS		
IL-1 α IL-1 β (15-17)	Monocitos, macrófagos.	Fiebre (pirógeno endógeno), sueño, anorexia, inflamación, expresión de CD54 en las células endoteliales y liberación del factor tisular, activación linfocitaria, producción de IL-6 y CSF.
IL-2 (15)	Linfocitos Th1	Induce la proliferación de la célula T, coestimula la proliferación y diferenciación de la célula B.

IL-3 (25) Multi CSF	Células T y mastocitos	Estimula la proliferación de distintos linajes celulares: eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos, granulocitos y monocitos. Potencia a las NK y LAK (agresoras activadas por linfoquinas).
IL-4 (20)	Linfocitos B y T, mastocitos.	Induce la proliferación del mastocito, proliferación de la célula hematopoyética pluripotencial.
IL-5 (45)	Linfocitos Th2, mastocitos.	Induce la proliferación de la célula T y la generación de LTC, coestimula la proliferación de la célula B, sinergiza con la IL-3 en la proliferación del mastocito, estimula la producción del IgE e Ig G 4. Induce la expresión y liberación de CD23, la clase II del CMH en la célula B, cambia de Th a Th2.
IL-6 (23-30)	Monocitos y fibroblastos	Induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de Ig A.
IL-7 (25)	Estroma de médula ósea y Timo	Pirogénica, induce la proliferación de plasmocitomas e hibridomas, aumenta la producción de Ig, acción con la IL-2 en la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de células hematopoyéticas, induce la diferenciación del LTC. Induce la proliferación de las células pro y pre B de los linfocitos inmaduros.
IL-8 (6.5)	Monocitos, células endoteliales, macrófagos, alveolares, fibroblastos.	Induce la quimiotaxis y activación de neutrófilos y células T.
IL-9 (30-40)	Linfocitos Th	Activa la proliferación de células Th.
IL-10 (17-21)	Linfocitos Th2	Induce la proliferación de algunas células T, potencia la proliferación del mastocito inducido por IL-3.

IL-11(24)	Células T, células B activadas y monocitos	Inhibe la activación del MAC, estimula la producción de célula B y la producción de Ac, estimula los mastocitos y cambia de Th a Th2.
IL-12 (75)	Células del microambiente hematopoyético	Estimula la producción de Ac, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de megacariocitos, estimula los progenitores de macrófagos. Inductor del INF- γ .
IL-13 (10)	Monocitos, macrófagos, algunas células B y mastocitos	Activa a las NK para secretar IFN γ e inhibe la producción de IgE inducida por IL-4.
IL-14	Células T	Induce la proliferación y diferenciación de células B e inhibe la producción de IL-1.
IL-15 (14-15)	Células B y macrófagos	Induce la secreción de IgE.
IL-16 (56)	Células T	Induce la proliferación de células B.
IL-17 (20-30)	Células no linfoides y musculares	Induce la proliferación y diferenciación de la célula NK.
IL-18	Células endoteliales y monocitos	Inmunomodulatoria.
INTERFERONES		
IFN- α (18-20)	Linfocitos	Coestimula la producción de células T, induce la secreción de IL-6, IL-8 y G-CSF a partir de las células endoteliales, epiteliales y fibroblásticas.
IFN- β	Fibroblastos y células amnióticas	Incrementa la expresión de antígenos de clase I y II HLA, activa células NK e induce la producción de IFN γ .
IFN- γ (20-25)	LTh2, linfocitos citotóxicos, NK y macrófagos	Posee efectos antivirales e inmunomodulatorios. Es quimiotáctico para monocitos y aumenta en ellos la expresión de HLA clase I.

FACTORES DE NECROSIS TUMORAL		
TNF- α (17)	Fibroblastos, células NK, neutrófilos, astrocitos, células endoteliales y células del músculo liso	Proinflamatorio, antitumoral. Agente neovascularizante y estimulante de la resorción ósea.
TNF- β (25)	Linfocitos T	Estimula neutrófilos.
FACTORES ESTIMULADORES DEL CRECIMIENTO		
TGF- α (5-20)	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales	Induce la proliferación de los progenitores de los granulocitos y de los monocitos, activación de macrófagos, aumenta la producción de leucotrienos en eosinófilos y la actividad tumoricida de monocitos. Induce la proliferación de granulocitos.
TGF- β (28)	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales	Induce la proliferación de monocitos. Actúa como un inhibidor de la proliferación en diversos tipos celulares.
PDGF	Plaquetas	Activación plaquetaria, principalmente actúa regulando mecanismos de adherencia.
FGF	Tejido conectivo	Proliferación de fibroblastos, síntesis de colágena y macromoléculas de matriz intersticial.
EGF	Células de lámina basal epidermal	Crecimiento y diferenciación de epitelios.
ILGF-1 ILGF-2 (55-70)	Hígado y células del sincitiotrofoblasto respectivamente	Promueve la proliferación y diferenciación de múltiples tejidos contribuyendo al desarrollo corporal postnatal y embrionario.

QUIMIOCINAS		
C (carece del primer y tercer residuo de cisteína conservados) Ej: Linfotaxina (LPTN)	Plaquetas, placenta, riñon, hueso, células T y B.	Induce la angiogénesis, la proliferación de los queratinocitos, la resorción ósea y la proliferación tumoral.
C-C Ej: MCP-1	CD8 activados, mastocitos.	Induce la quimiotaxis de las células T y NK, inhibidor de la proliferación en células de tumorigénicas.
CXC Ej: IL-18		Induce la quimiotaxis de las células T, NK, basófilos y eosinófilos.

Efectos de las citocinas en la hematopoyesis (Tomado y modificado de Aguirre et al, 2002).

Receptores de citocinas

Las citocinas se unen a su receptor para mediar una señal intracelular que tiene como resultado final la expresión de un gen (**Metcalf, 2008**). A nivel estructural básico la mayoría de los receptores de las citocinas consisten en un complejo de subunidades las cuales están compuestas principalmente por una subunidad de unión a su ligando (citocina), una fracción transmembranal y una subunidad intracelular que se encargará de transmitir la señal de transducción al interior de la célula (**Taniguchi, 1995; Baker et al., 2007**). La subunidad encargada de transmitir la señal intracelular puede ser compartida por diferentes receptores creando así una familia de receptores en la cual la misma subunidad es la que transmite la cascada de señalización intracelular (**Taniguchi, 1995; Baker et al., 2007**). La mayoría de los subtipos de receptores de las citocinas están agrupados en diferentes subfamilias dependiendo de la estructura del receptor (**Miyajima et al., 1992; Barry et al., 1997; Metcalf, 2008**). Existen 6 familias de receptores de citocinas donde los receptores de la familia uno engloba a la mayoría de los receptores de las citocinas hematopoyéticas tal es el caso del GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15 y prolactina, esta familia se caracteriza por que su dominio extracelular no va más allá de 210 aminoácidos (aa) y este sitio puede contener uno o más residuos conservados de cisteína (C). También presentan una segunda secuencia conservada de residuos de tipo triptófano-serina-X- triptófano-serina (W-S-X-W-S), donde X, se refiere a un

residuo no conservado de algún aminoácido, la región extracelular también cuenta con dos dominios de fibronectina considerados como módulos de fibronectina III, una región de bisagra que conecta estos dos módulos la cual está compuesta de aproximadamente 100 aa. Esta región que también guarda el motivo W-S-X-W-S está destinada para ser el dominio de interacción con el ligando (**Barry et al., 1997**). Por otra parte el dominio citoplasmático del receptor de la citocina está compuesto por una región proximal a la membrana la cual recibe el nombre de Box 1, un motivo rico en prolina que también cuenta con otra fracción cerca a Box 1 denominada Box 2 (**Ihle et al., 1995**).

La región Box 1 es fundamental para las señales de diferenciación, ya que esta región es la que se encarga de mediar las señales mitogénicas en la célula (**Ihle et al., 1995**) y existen ciertas regiones citoplasmáticas del receptor que no contienen ni Box 1 ni Box 2 y pueden variar de receptor a receptor. La segunda familia es la de los receptores tipo 2, la cual se caracteriza por tener un dominio conservado de cisteína, en esta familia encontramos al receptor del interferón α , β y γ , así como la IL-10. La tercera familia está compuesta por aquellos receptores con dominios extramembranales tipo inmunoglobulina y está compuesta principalmente por el receptor G-CSF. La cuarta familia es la del receptor del factor de necrosis tumoral, está compuesta por el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nervious growth factor*), CD40 y el TNF (**Baker et al., 2007**). La quinta familia que corresponde a los receptores acoplados a proteínas G, la cual se caracteriza por tener 7 dominios transmembranales y está compuesta básicamente por las quimiocinas (**Baker et al., 2007; Steevels y Meyaard, 2011**). Por otro lado están los receptores tipo tirosina-cinasa los cuales se caracterizan por tener 5 dominios tipo inmunoglobulinas en la región extracelular, seguido de un dominio intracelular (**Prieto y Miller, 2011**). En esta familia podemos agrupar al receptor C-kit, al M-SCF, al factor de crecimiento derivado de plaquetas principalmente (PDGF, del inglés, *platelet derived growth factor*) (Figura 3). Es importante resaltar que existen otras formas de dividir los receptores de las citocinas hematopoyéticas, por ejemplo mediante su sub-unidad funcional intracelular (**Baker et al., 2007**).

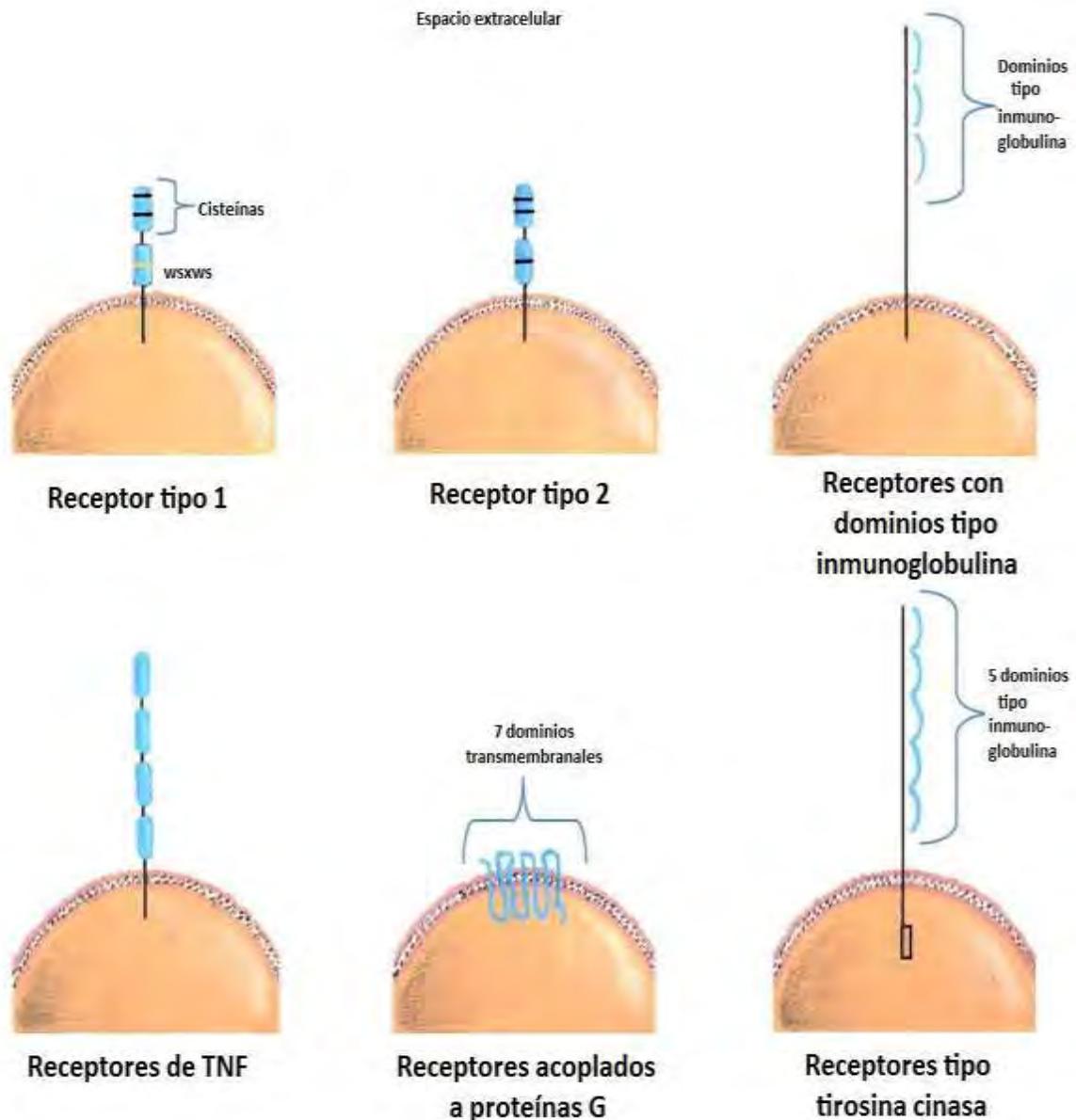


Figura 3. Características estructurales de las diferentes familias de los receptores de las citocinas hematopoyéticas. Las familias de los receptores está compuesta principalmente por la familia de los receptores tipo 1 (GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, HGF y prolactina, principalmente); la familia de los receptores tipo 2 (INF α , β y γ , así como la IL-10); familia de receptores con dominio tipo inmunoglobulina (G-CSF, principalmente); la cuarta familia es la del receptor del factor de necrosis tumoral (NGF, CD40 y el TNF principalmente); la quinta familia corresponde a la de los receptores con 7 dominios transmembranales (quimiocinas); una última familia que incluye a los receptores tipo tirosina cinasa (M-CSF, SCF e IL-1).

Transducción de señales de las citocinas

La finalidad de una citocina al unirse con su receptor es la de encender un gen para poder inducir una respuesta biológica. Este evento se lleva a cabo mediante una señal de transducción la cual se desencadena cuando el receptor se une a su ligando y es dependiendo del tipo de receptor y ligando, la cascada de señalización que se activa (**Baker et al., 2007**).

Los estudios realizados durante los últimos 10 a 15 años, han puesto de manifiesto que la señalización de receptores de citocinas hematopoyéticas esta mediada en gran parte por una familia de tirosinas cinasas llamadas Janus cinasas o JAK y sus factores de transcripción abajo en la vía de señalización denominados STAT (del inglés *signal transducer activator transcription*) (**Jatiani et al., 2010**). La familia JAK está compuesta por cuatro miembros JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 (**Firnbach et al., 1990**). En general, la unión del receptor con su ligando se lleva a cabo mediante una dimerización/oligomerización de lo cual resulta una yuxtaposición de JAK, una vez que se da este evento, la activación de JAK parece ser resultado de su fosforilación, ya sea por que esta se autofosforila o la fosforilación es a través de otras JAK's o de otra familia de tirosina cinasas (**Darnell et al., 1994; Ihle et al., 1997**). Esta activación da como resultado un aumento de la actividad de JAK que así activada, fosforila residuos de tirosina en los receptores de destino que sirven como sitios de acoplamiento, que permiten la unión de otras moléculas de señalización que contienen el dominio SH2 tales como STAT y otras proteínas (**Baker et al., 2007; Jatiani et al., 2010**). Pero en sí, el blanco de las JAK's es activar a un grupo de señales transductoras activadoras de la transcripción (STAT's) por lo tanto se ha establecido que el sustrato de JAK es STAT. La familia de las STAT's, está compuesta por seis diferentes isoformas (STAT 1 – STAT 6) y la activación de cada una de estas depende de las subunidades de los diferentes receptores de las citocinas. La finalidad de STAT es la de translocarse al núcleo de la célula para encender genes promotores los cuales desempeñaran una función específica (**Darnell et al., 1994; O'Shea et al., 2002**). Sobre la base de estos resultados, se ha propuesto un segundo modelo de activación de STAT, donde la cinasa JAK puede ser más crucial para la fosforilación de los receptores de citocina y factores de crecimiento. Por otra parte, la fosforilación mediada

por JAK puede crear sitios de anclaje en los receptores para la unión de las proteínas que contienen sulfhidrilos (SH) tales como las cinasas Src y otros productos intermedios de señalización. Cinasas JAK o Src, a continuación, inducen la fosforilación de tirosinas y la activación de proteínas STAT. Estas observaciones sugieren que 2 vías independientes pueden mediar la activación de STAT, uno que es dependiente de JAK y la otra que es dependiente de diferentes tirosina cinasas, tales como cinasas de la familia Src (**Baker et al., 2007; Jatiani et al., 2010**), siendo de esta vía característico que se puedan encender cascadas de señalización alternas como es la vía PI3K-AKT y la vía RAF-ERK, así como la vía RAS-MAPK (**Reddy et al., 2000; Gartsbein et al., 2006**).

Por otra parte la cascada de señalización de los receptores tipo tirosina cinasa tienen la particularidad de activar la cascada de señalización que involucra segundos mensajeros como lo es el adenosin monofosfato cíclico (AMPC, del inglés *adenosin monophosphat cyclic*), así como la cascada de señalización que involucra al PI3K-AKT, la vía RAS-MAPK, la vía p85-AKT, así como también la vía alternativa de JAK-STAT. El objetivo final de ambas vías es activar factores de transcripción que encenderán genes específicos los cuales influirán sobre el linaje mieloide o linfoide (**Baker et al., 2007; Vanhaesebroeck et al., 2010**).

En resumen, la interacción ligando-receptor da como resultado la activación de señales bioquímicas. Estas señales terminan activando factores de transcripción y consecuentemente la expresión de productos proteicos de genes específicos, que mantienen la sobrevivencia, disparan la proliferación o promueven la diferenciación hacia células sanguíneas maduras. Sin embargo, la regulación de la hematopoyesis puede presentar alteraciones en las diferentes fases, que resulten en modificaciones cuantitativas y funcionales en las poblaciones de células hematopoyéticas (**Dominguez, 2012**).

Respecto a las citocinas supresoras, entendido esto como la capacidad para regular negativamente la síntesis de ADN, proliferación, viabilidad y diferenciación celular, pueden mencionarse el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Interferón alfa (INF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) el ligando 3 de las CC quimiocinas (CCL3/MIP-1 α), y

la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), entre otras, (**Hamblin, 1993; Jacobsen et al., 1994; Cheng y Wang, 2002**).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF)

Existen dos citocinas que responden a este nombre, el factor de necrosis tumoral alfa o cachectina (TNF- α) y factor de necrosis tumoral beta o linfoxina (TNF- β). Ambas citocinas son codificadas por genes distintos e interaccionan con los mismos receptores de membrana, originalmente caracterizadas por su capacidad de inducir apoptosis de células tumorales y la caquexia, ahora se consideran como mediadores centrales de una amplia gama de actividades biológicas (**Tracey y Cerami, 1994; Pfeffer, 2003**). El TNF pertenece a la superfamilia de mediadores que llevan su mismo nombre, y entre las similitudes que comparten los miembros de esta superfamilia están el ser proteínas que se expresan principalmente en la membrana celular y participan en la regulación de la proliferación celular y apoptosis, aunque varios miembros tal como TNF- α , tienen una importante actividad proinflamatoria (**Dinarello y Moldawer, 1999**).

En particular, la glicoproteína TNF- α madura se encuentra expuesta en la membrana celular, contiene 233 aa, pesa 26kDa, es biológicamente activa y participa en la citotoxicidad e inflamación por interacción celular, el TNF- α soluble corresponde a una proteína de 17kDa conformada por 157 aa, producida a partir del TNF- α de membrana, el cual es procesado por cortes a nivel del residuo 76 por acción de la enzima convertidora del TNF- α (TACE) una metaloproteína que está también en la membrana celular (**Tracey, 1994; Ibelgaufits, 1995; Dinarello y Moldawer, 1999**). En un principio se pensaba que el TNF- α era exclusivamente producido por monocitos y macrófagos (**Lange et al., 1991; Lejeune et al., 1998**), sin embargo se ha observado *in vitro*, que existen muchos tipos celulares capaces de sintetizar TNF- α (**Sidhu y Bollon 1993**), entre estos: las células de leucemia promielocítica aguda, timocitos, linfocitos T y B, células NK, fibroblastos (**Bharat y Jordan 1992; Hamblin 1993**) y más recientemente se ha demostrado que células CD34+ humanas expresan constitutivamente el gen de TNF- α entre otros (**Janowska et al., 2001**).

El TNF- α es un importante inmunomodulador y agente antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, es por ello que ha sido estudiado con el objetivo de establecer una alternativa terapéutica en tratamientos de cáncer. Así en estudios preclínicos se ha administrado en combinación con otras citocinas y agentes quimioterapéuticos (**Beyert y Fiers 1998**), sin embargo sólo en muy pocos casos se han logrado actividades sinérgicas favorables y remisiones parciales (**Negrier et al., 1992**).

El papel del TNF- α en hematopoyesis se ha estudiado ampliamente; anteriormente se le conocía como un factor citotóxico, sin embargo estudios posteriores demostraron que el TNF- α tenía propiedades estimuladoras del crecimiento en diversos tipos celulares (**Vilcek et al., 1986; Digel et al., 1989**).

Además, se reportan efectos tanto estimuladores como inhibidores de células troncales y células progenitoras hematopoyéticas, dependiendo de los factores de crecimiento usados como suplementos. Así, el TNF- α estimula el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas humanas estimuladas con IL-3 y GM-CSF donde eleva el crecimiento de cultivos de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de ratón (**Caux et al., 1990; Blackx et al., 1991**), pero inhibe fuertemente a células incubadas con G-CSF y factor de células tallo (SCF) (**Degliatoni et al., 1985; Murphy et al., 1988; Caux et al., 1990**). Otros trabajos, reportan que el TNF- α murino inhibe el crecimiento de células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo (CFC-APP) a partir de células progenitoras hematopoyéticas primitivas Lin-Sca-1+ a pesar de la presencia de factores de crecimiento en estos experimentos (**Zhang et al., 1996**).

La inhibición hematopoyética debida al TNF- α es variable (**Munker et al., 1998**), y el efecto puede ser indirecto, el cual depende de la fracción celular separada de la médula ósea y del tipo de medio condicionado empleado como fuente que libera factores de crecimiento hematopoyético. La acción indirecta del TNF- α es mediante la liberación de factores supresores por células accesorias (**Beutler y Cerami, 1989**), que pueden actuar junto con el TNF- α para observar finalmente la inhibición de la hematopoyesis (**Pennica et al., 1984**;

Broxmeyer et al., 1986; Murphy et al., 1988; Lu et al., 1999; Yamaguchi et al., 1999; Martínez et al., 2001).

Existe además evidencia que relaciona la activación de uno u otro receptor de TNF, a saber el p55 o p75 que a pesar de ser similares en su secuencia extracelular, sus dominios intracelulares son diferentes, y por tanto desempeñan diferentes funciones. La estimulación de p55 puede mediar citotoxicidad, proliferación de fibroblastos, resistencia a la clamidia, síntesis de prostaglandinas; mientras que p75 puede mediar la proliferación de timocitos de ratón y humano, fibroblastos humanos, célula mononucleares y células natural killer (NK). Se ha observado que estos receptores pueden regular el crecimiento de progenitores de médula ósea primitivos, sin embargo debido a sus efectos bidireccionales es difícil asentar sus efectos en la regulación de la hematopoyesis *in vivo* (Lu et al., 1999).

INTERFERON GAMMA (INF- γ)

Los interferones (INF) fueron originalmente descubiertos como agentes que interfeerían con la replicación viral. Inicialmente, fueron clasificados por el tipo de célula que los secretaba, pero ahora se clasifican en tipo I, II y III de acuerdo con la especificidad del receptor y la secuencia homóloga (MacMicking, 2012).

INF- γ , mejor conocido como interferon tipo II, es una citocina inmunoreguladora que juega un papel importante en la defensa del organismo por actividad anti-viral, anti-proliferativa (Wheelock, 1965; Billiau y Matthys, 2009).

La forma activa de INF- γ consiste en un homodímero de 20-25 kDa con subunidades variablemente glicosiladas (Gray y Goeddel, 1982). Inicialmente se creía que el INF- γ solamente era producido por linfocitos T CD4⁺ (específicamente los Th1), linfocitos CD8⁺ y las células NK. Sin embargo existe evidencia que otras células como linfocitos B, las células NKT, células presentadoras de antígeno profesionales (CPAs) entre otras, secretan también INF- γ para su propia activación y la de células adyacentes a ellas. El INF- γ secretado por las células NK es muy importante en la defensa temprana del hospedador contra infecciones,

mientras que los linfocitos T CD4⁺:Th1 se convierte en la principal fuente de INF- γ en la respuesta inmune adaptativa (**Bonjardim, 2005; Lavani y Pareek, 2010**).

Una vez que INF- γ se une a su receptor la señal se transmite a través del homodímero transductor de señal y activador de transcripción (STAT1) en respuesta a INF- γ o a través del heterodímero STAT1-STAT2 en respuesta a los INFs tipo I y al IFN tipo III. Posterior a este reclutamiento, las moléculas de STAT son fosforiladas a través de la tirosina cinasa asociadas a receptores de la familia Janus (JAK), con la finalidad de translocar al núcleo para promover el encendido de genes efectoros (**Farrar y Schreiber, 1993; Schroder *et al.*, 2004**).

El INF- γ promueve la activación de macrófagos, mediante la inducción de una amplia gama de proteínas, otra función adscrita al INF- γ es la de aumentar los antígenos de histocompatibilidad clase I, los cuales son fundamentales para la activación de linfocitos T citotóxicos que sería la respuesta más adecuada contra células malignas o infectadas por virus (**Farrar y Schreiber, 1993; Lavani y Pareek, 2010**).

PROTEINA QUIMIOATRAYENTE DE MONOCITOS (MCP-1/CCL2)

Las quimiocinas constituyen una familia de citocinas quimiotácticas y se subdividen en cuatro familias sobre la base del número y el espaciamiento de los residuos conservados de cisteína en el extremo N-terminal de la proteína. Las quimiocinas juegan un papel importante en el reclutamiento selectivo de monocitos, neutrófilos y linfocitos, así como en la inducción de quimiotaxis a través de la activación de los receptores G acoplados a la proteína (**Deshmane *et al.*, 2009**).

MCP-1/CCL2 es un miembro de la familia de las quimiocinas CC, y un potente factor quimiotáctico para los monocitos humanos (**Cochran *et al.*, 1983**).

Fue la primer quimiocina humana descubierta, situada en el cromosoma 17, MCP pertenece a una familia compuesta por al menos cuatro miembros (MCP-1, -2, -3, y -4), MCP-1 humana se compone de 76 aa y su tamaño es de 13 kDa, (**Van Coillie *et al.*, 1999**). Es producida por una gran variedad de tipos de células, ya sea constitutivamente o después de la inducción

por el estrés oxidativo, citocinas, o factores de crecimiento. El análisis mutacional de CCL2 ha dado lugar a la identificación de dos regiones de la estructura primaria que son críticos para la actividad biológica (**Beall et al., 1996**). Entre las células que producen esta quimiocina están incluidas las endoteliales, fibroblastos, epiteliales, células de músculo liso, mesangiales, astrocíticas, monocitos y células microgliales (**Cushing et al., 1990; Standiford et al., 1991; Brown et al., 1992; Barna et al., 1994**). Estas células son importantes para las respuestas inmunes o antivirales en la circulación periférica y en los tejidos. Sin embargo, los monocitos/macrófagos son las principales fuentes de CCL2 (**Yoshimura et al., 1989a; 1989b**).

Las quimiocinas y sus receptores se han detectado en la mayoría de los tumores (**Conti y Rollins, 2004**). Sin embargo, hasta la fecha ningún gen de susceptibilidad en cualquier tipo de cáncer ha sido asignado a una quimiocina o receptor de quimiocinas. Las quimiocinas participan en una amplia gama de actividades normales del huésped con cáncer, por lo tanto, es posible que tenga efectos importantes en la patogénesis del cáncer. Por esta razón, podría esperarse que las quimiocinas participen ya sea promoviendo o inhibiendo el crecimiento de las células cancerosas en función de la configuración particular en el que se expresan (**Deshmane et al., 2009**).

INTERLEUCINA 6 (IL-6)

La IL-6 es una glicoproteína, con una α -hélice y 184 aminoácidos, de 22 a 28 kDa, que desempeña un papel importante en la reacción de fase aguda, la inflamación, el metabolismo óseo, la progresión del cáncer, juega un papel crucial en la hematopoyesis, entre otros (**Heinrich et al., 2003; Schuett et al., 2009; Erta et al., 2012; Garbers et al., 2012; Mihara et al., 2012; Mansell y Jenkins, 2013**).

Es producida por diversos tipos celulares: monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, sinoviocitos, células de la glía, adipocitos y células epiteliales intestinales, entre otras (**Fink, 2001**). Sus efectos están mediados por varias vías de señalización, en particular por la vía de STAT3 y en menor cuantía STAT1 (**Guo et al.,**

2012). Los principales estímulos para su síntesis y liberación son las infecciones por ciertos microorganismos, particularmente virus y bacterias (lipopolisacárido bacteriano) y la acción de otras citocinas, como la IL-1, TNF- α y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF. Asimismo, sus principales objetivos o dianas celulares son los linfocitos T y B, las células epiteliales, los monocitos/macrófagos y los hepatocitos (**Bataille y Klein, 1992; Banks et al., 1995; Abbas et al., 1997; Haynes y Fauci, 2006; Varela y Crispin, 2006; Scheller et al., 2006**). Es una citocina pluripotencial ya que tiene acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. En la actualidad se la reconoce como el principal mediador de la respuesta de fase aguda; también posee efectos antiinflamatorios al poseer un control parcial sobre la producción de IL-1 y TNF- α . A diferencia de estas últimas que poseen acciones proinflamatorias, los efectos de la IL-6 en la inmunidad depende del contexto y de su concentración local, así como de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras que actúan en la vía de transducción de señales, o de la concentración de su receptor soluble (**Choy, 2004; O'Malley y Moldawer, 2006**).

En el sistema inmune, la IL-6 promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1. En este sentido, la IL-6 tiene acciones antiinflamatorias y, junto con el aumento en la producción de cortisol, ayuda a controlar la respuesta inflamatoria (**Abbas et al., 1997; Papanicolaou et al., 1998; Fink, 2001; Haynes y Fauci, 2006**). También induce la liberación del antagonista del receptor de la IL-1 y del receptor soluble del TNF- α (**Choy, 2004**).

La IL-6 mejora la proliferación de las células madre hematopoyéticas y la diferenciación de las células B de memoria y células plasmáticas (**Cerutti et al., 1998**). Además, coestimula el crecimiento de diferentes colonias de granulocitos y macrófagos e interviene en la proliferación y maduración de la serie megacariocítica (**Florensa et al., 2006**).

Como ya se menciona, este conjunto de citocinas participa activamente en la generación de células sanguíneas, ya sea para su producción, detención, etc., una desregulación de este proceso puede desembocar en enfermedades malignas como leucemias.

Como ya se mencionó, dentro de la familia de las citocinas se incluye a los factores estimuladores de colonias (CSF). Originalmente descritos en la década de 1960 y a principios de 1970 como glicoproteínas que inducían el crecimiento clonal de diferentes linajes hematopoyéticos de la médula ósea (**Metcalfe, 2008**). Una variedad de estos factores fueron nombrados por sus funciones utilitarias: M-CSF estimula la monocitopoyesis, mientras que multi-CSF ahora conocido como IL-3, induce el crecimiento de todos los diferentes tipos de células hematopoyéticas (**Douglass et al., 2008**). Por el contrario, las citocinas conocidas como co-estimuladoras muestran un efecto directo pequeño o nulo en la formación de colonias, pero tienen la capacidad de actuar de manera sinérgica con los CSF. Ejemplos de esto lo constituyen el SCF o ligando c-kit y el ligando del FLT3. SCF es un factor de crecimiento, que reacciona con el receptor c-kit presente en progenitores multipotenciales de médula ósea, acelera su entrada en el ciclo celular y en cooperación con BCL-2 impide apoptosis, además influye en la diferenciación a todos los linajes hematopoyéticos y puede colaborar con casi todas las citocinas hematopoyéticas conocidas para promover la formación de colonias (**Fey, 2007**).

FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS-MACRÓFAGOS (GM-CSF)

El GM-CSF es una glicoproteína monomérica de 14-35 KDa que induce la proliferación y diferenciación de células progenitoras de la médula ósea del linaje granulocito-macrófago y está involucrado en la respuesta fisiológica durante infecciones y procesos inflamatorios. Es producido por células T (Th1 y Th2), linfocitos B de la zona del manto, macrófagos, células cebadas, células endoteliales, células epiteliales, neutrófilos y fibroblastos en respuesta a diferentes estímulos activadores de la respuesta inmune (**Liu y Grundström, 2002**).

El gen del GM-CSF humano se localiza en el cromosoma 5q31.1 y es procesado para originar un mRNA de 3175 pb formado por 4 exones. En ratón, el gen se localiza en el cromosoma 11 en un locus que forma parte de un cluster de citocinas que incluye a los genes para IL-4, IL-5 e IL-13. Se sabe que la expresión de GM-CSF es tejido específica y puede ser inducida en

respuesta a agentes proinflamatorios como LPS, IL-1, IL-2, INF- γ , TNF- α y TNF- β ; siendo esta expresión dependiente de calcio (**Cockerill et al., 1999**).

La expresión del GM-CSFR en el humano es regulada negativamente por GM-CSF, TNF- α y moléculas que activan a proteína cinasa C (PKC) en neutrófilos, monocitos y progenitores mieloides (**Cannistra et al., 1990**). El GM-CSFR es un receptor heterodimérico que se compone de una cadena alfa específica de la citocina (GM-CSFR α de 45 KDa) la cual se une a su ligando con baja afinidad ($K_d=3-7nM$) y una cadena común beta (GM-CSFR β de 120 KDa) que es la transductora de la señal, siendo compartida con los receptores a IL-3 e IL-5 y se asocia con la subunidad α , para formar un receptor de alta afinidad ($K_d=20-40pM$). GM-CSFR α también puede estar presente en células no hematopoyéticas como células de la placenta y melanoma, mientras que la presencia de GM-CSFR β se encuentra restringido a células mieloides (**Xiao et al., 1994**).

El GM-CSFR no tiene dominio de tirosina cinasa intrínseco por lo que recluta proteínas cinasas relacionadas con Src, como la proteína JAK2, que tiene 7 regiones de homología, llamados dominios JH (homólogos a Janus), que comparten las características de otros dominios de tirosinas cinasas. Esta proteína posee un dominio de pseudocinasa llamado JH2, que es esencial para la actividad de fosfotransferasa y es capaz de acoplarse a STAT; aunque la secuencia amino terminal de JAK2 es quién confiere la unión a la cadena β del receptor (**Ortmann et al., 2000**).

El GM-CSF estimula el desarrollo *in vitro* y la diferenciación de colonias de células progenitoras del linaje granulocito-macrófago, aunque también potencia la fagocitosis de neutrófilos y monocitos maduros (**Metcalf et al., 1986**). En leucocitos polimorfonucleares (PMN) y eosinófilos humanos aumenta el metabolismo oxidativo y aumenta la sobrevivencia celular (**Begley et al., 1986**).

El GM-CSF *in vivo* interviene en el reclutamiento y activación de células mieloides a sitios de inflamación; estimula la actividad antimicrobiana de monocitos y linfocitos, lo que resulta de interés para el tratamiento de enfermedades infecciosas en pacientes con SIDA (**Blanchard et al., 1991**). Por otro lado, también se postula su uso como molécula

diferenciadora en pacientes con inmunodeficiencias que desarrollan neutrocitopenia (**Hewit et al., 1993**).

Con respecto a la liberación de citocinas, el GM-CSF aumenta la producción de IL-1 e indirectamente puede estimular la liberación de IL-2 en células procesadoras de antígenos. Además, junto con IL-3 puede activar la citotoxicidad de monocitos humanos, por inducción de TNF- α (**Morrisey et al., 1987**). La interrupción en la expresión del gen GM-CSF tiene un efecto relativamente bajo en el linaje macrofágico, con la excepción de defectos funcionales en macrófagos alveolares, por lo que su expresión no es esencial en el desarrollo de poblaciones de macrófagos independientes de M-CSF (**Guidez et al., 1998**).

FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITO (G-CSF)

El G-CSF es una glicoproteína monomérica de 24-25 kDa que regula la proliferación, diferenciación y activación de las células hematopoyéticas (**Metcalf et al., 1986; Tsuchiya et al., 1986**). Los monocitos y los macrófagos se encuentran entre la principal fuente de G-CSF, pero este factor también puede ser producido por las células de origen mesodérmico, entre otras (**Salmassi et al., 2010**). La producción de G-CSF puede ser inducida *in vitro* en estas células por una amplia variedad de agentes estimulantes incluyendo lipopolisacáridos, IL-1, IL-3, IL-4, INF γ , TNF- α y GM-CSF (**Santibañez y Espino, 2013**).

El G-CSF humano se purificó a partir de la línea celular de carcinoma de vejiga. Es una molécula hidrofóbica que contiene 174 aa, con un sitio de glicosilación tipo "O" en la tirosina 133. El peso molecular varía si está glicosilado o no. La glicosilación puede tener efectos significativos sobre la función del factor de crecimiento, ya que estudios *in vitro* sugieren que la forma glicosilada tiene una mayor efectividad a corto plazo sobre la proliferación de colonias granulocíticas y neutrófilos. Además glicosilado es más resistente a la degradación en suero, tiene mayor efectividad que el no glicosilado debido a la mayor afinidad por su receptor (**Chávez, 2006**).

El G-CSF tiene la propiedad de regular la producción, proliferación, diferenciación y maduración de progenitores mieloides hacia granulocitos y monocitos/macrófagos (**Kaplinsky et al., 2003**). Si se adiciona G-CSF natural o el recombinante humano (rhG-CSF), se observa un crecimiento de colonias celulares dependiente de la dosis, y a concentraciones mayores o iguales a 100 U/mL (1ng/mL) induce una proliferación óptima, principalmente de granulocitos (**Lieschke y Burgess, 1992; Goldman, 1995; Nagler et al., 1996, Van de Gejin et al., 2004**).

El receptor para el G-CSF es una cadena polipeptídica simple de 150 kD transmembranal y es miembro de la superfamilia de los receptores de las citocinas (**Avalos et al., 1990**). Los receptores para el G-CSF son específicos, tienen una sola afinidad y se presentan en progenitores mieloides, granulocitos maduros, monocitos y algunos linfocitos T y B (**Joshi et al., 2001**). El número de receptores en los neutrófilos en humanos aumenta ligeramente con la maduración de la célula. La unión del G-CSF a su receptor ayuda a una disminución en el número de receptores de superficie, así como a que el complejo receptor-G-CSF sea internalizado y degradado. La unión, la internalización y la degradación se requieren para que el G-CSF actúe (**Nicola, 1987**). En muchas células, este tipo de receptores activan la transcripción de genes específicos, al menos por las siguientes vías: a) la cinasa-C activa una cascada de proteínas cinasas que ayudan a la fosforilación y activación de una proteína reguladora unida al ADN; b) la activación de la cinasa-C ayuda a la fosforilación de una proteína inhibidora, que se activa y libera una proteína reguladora citoplasmática que migra al núcleo y estimula la transcripción de genes específicos (**Alberts et al., 1994**).

En la actualidad G-CSF es el movilizador de células troncales hematopoyéticas convencional clínico sin embargo no es efectivo en todos los pacientes (**Pelus y Fukuda, 2008**), también es usado como un regulador fisiológico de la respuesta sistémica a neutropenia e infecciones. Se ha visto que el rhG-CSF no glicosilado es muy importante desde el punto de vista clínico, ya que permite una restauración de la hematopoyesis en enfermedades relacionadas con neutropenia secundaria a quimioterapia mieloablativa, drogas y/o radiación (**Gabrilove y Jakubowski, 1989; Acquntella, 1995**); además, ayuda en la disminución de episodios febriles post-quimioterapia de leucemias linfoides agudas y tumores sólidos (**Acquntella,**

1995). El uso del G-CSF ha disminuido la morbilidad de pacientes que recibieron un programa completo de terapia, al administrar grandes dosis de agentes antineoplásicos con o sin trasplantes de médula ósea, o agentes limitantes de toxicidad hematopoyética (Gabrilove y Jakubowski, 1989; Ganser y Karthaus, 1996), ayuda en la estimulación y producción de células efectoras con capacidad antitumoral (Gabrilove y Jakubowski, 1989).

FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE MACRÓFAGOS (M-CSF)

El M-CSF, es una citocina específica de linaje, la cual estimula la supervivencia, proliferación y maduración de progenitores monocíticos *in vivo* e *in vitro* (Bost *et al.*, 2000; Shouqing *et al.*, 2000; Tagoh *et al.*, 2002). Su expresión es necesaria para mantener el fenotipo monocítico en la célula, aunque no es suficiente para inducir un compromiso irrevocable a la diferenciación (Pierce *et al.*, 1990).

El M-CSF originalmente observado en macrófagos también se expresa constitutivamente en otros tipos celulares como células epiteliales de ovario y del trofoblasto. El M-CSF interactúa con una clase de receptores de alta afinidad expresados específicamente en células del linaje monocítico-macrófago y células endoteliales (DeKoter *et al.*, 1998). Durante el desarrollo del ratón es expresado en fagocitos del saco vitelino y su expresión es mantenida durante toda la vida adulta (Tagoh *et al.*, 2002).

El M-CSF es un homodímero formado por puentes disulfuro que se sintetiza como proteína transmembranal y es procesada por proteólisis para producir su forma soluble, cuyo peso molecular varía de 70-90 kDa. Se sabe que la porción biológicamente activa del M-CSF consta de 152 aminoácidos en la región amino terminal, aunque, estudios estructurales indican que M-CSF es una molécula que necesita la adición de glucosaminoglicanos para tener actividad biológica (Shouqing *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2001).

La expresión del M-CSF y su receptor (M-CSFR, CSF-1R o c-fms) se han relacionado con un compromiso de las células precursoras multipotenciales a macrófagos, ya que su expresión está restringida a este linaje (Tagoh *et al.*, 2002). Se sabe que la diferenciación hacia

macrófago está precedida por la aparición del receptor en la superficie. Existe la posibilidad que se pueda detectar bajos niveles de mRNA del proto-oncogen c-fms en precursores mieloides, por el contrario, puede no detectarse la proteína en la superficie (**Orlic et al., 1995**). Sin embargo, los progenitores comprometidos de macrófagos toman la decisión de diferenciarse antes de la aparición de c-fms en la superficie celular (**Tagoh et al, 2002**).

El receptor a M-CSF (165 KDa) pertenece a la familia de tirosina cinasas tipo III, posee un dominio de unión al ligando extracelular, que se divide en 5 subdominios tipo inmunoglobulina (Ig) y un dominio intracelular de tirosina cinasa interrumpido por una secuencia de aminoácidos hidrofílicos, que terminan el inserto de cinasa (**Shouqing et al., 2000**). La síntesis de M-CSF puede ser inducida por IL-1, TNF- α , INF- γ , GM-CSF y el PDGF. Por el contrario, las prostaglandinas, glucocorticoides, TGF β y sustancias que logran un aumento de AMPc intracelular inhiben la síntesis de M-CSF (**Morris, 1991**).

El M-CSF humano es un potente quimioatrayente para células 32D con c-fms, lo que sugiere que el M-CSF sirve para reclutar monocitos de la circulación a sitios lesionados o inflamados (**Pierce et al., 1990**). Las células 32D no expresan el c-fms en forma constitutiva, por lo que la sola presencia de M-CSF no puede inducir su diferenciación a monocitos (**Soddu et al., 1996; Sweet y Hume, 2003**).

In vitro, el M-CSF es conocido por estimular la respuesta inflamatoria, mientras que *in vivo* es capaz de estimular a leucocitos PMN residentes para producir IL-6 y TNF- α (**Chapoval et al., 1998**).

HEMATOPOYESIS Y LEUCÉMIA

El desequilibrio en la hematopoyesis se traduce en serios problemas hematológicos, por ejemplo en enfermedades neoplásicas como la leucemia o cáncer de la sangre, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos. El carácter distintivo de estas neoplasias es el crecimiento y proliferación aberrante de tipo clonal de las células tumorigénicas iniciadoras del tumor (**Horny et al., 1990; David, 2005**).

Leucemia

La leucemia es un tipo de cáncer de las células sanguíneas. Se caracteriza por un incremento en el número de células hematopoyéticas aberrantes en médula ósea y en sangre periférica (**Cousar, 1999**). Se deriva de la expansión clonal de precursores hematopoyéticos que han perdido su capacidad para proceder a la diferenciación terminal y funcionalidad. La leucemia se origina de una acumulación de un número mínimo de eventos genéticos que resultan en el crecimiento celular acelerado y el bloqueo de diferenciación celular. Un gran número de alteraciones genéticas, incluyendo translocaciones cromosómicas específicas, se han identificado y ligado causalmente a la leucemogénesis, pero la base molecular y fenotipo de la leucemia permanece en gran medida desconocido (**Sánchez, 1997**).

La leucemia se divide en dos grupos: mieloides crónicas (LMC) o mieloides agudas (LMA) o de tipo linfocítica crónica (LLC) o aguda (LLA) (**Landis et al., 1999**). La leucemia crónica se caracteriza por curso indolente, su larga evolución y por la ausencia de células inmaduras y anormales. Las células que se producen tienen características morfológicas similares con los linfocitos, sin embargo, no son funcionales (**Kantarjian et al., 1988**). Las leucemias agudas son enfermedades caracterizadas por su evolución relativamente rápida y por la proliferación de células inmaduras denominadas “blastos” (**Gutierrez, 2006**).

La LMA se caracteriza por la acumulación de un gran número de células anormales que no logran diferenciarse ni son funcionales (**Fialkow et al., 1987**). Es el tipo de leucemia más común en los adultos, representando el 25% de todas las leucemias en el mundo occidental, teniendo la tasa de supervivencia más baja de todas las leucemias (**Robak y Wierbowska, 2009**).

Es conocido que la modulación positiva y negativa de la hematopoyesis es regulada por factores de crecimiento hematopoyético, cuyos niveles pueden ser modulados debido a la presencia de factores externos que influyen en la hematopoyesis. Las citocinas que inducen diferenciación en células hematopoyéticas normales, también pueden inducir a las células leucémicas a diferenciarse a células maduras o dirigir apoptosis, como en el caso de la combinación de quimioterapia con M-CSF en pacientes leucémicos (**Hasegawa et al., 2000**).

o el uso combinado de G-CSF y ácido retinoico para inducir madurez en la línea leucémica mielomonocítica WEHI3BD+ (Li y Sartorelli, 1992; Basu *et al.*, 2002).

Así, en años recientes se ha mostrado que el extracto, jugo, infusiones, entre otros derivados de plantas, modulan los niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivos de diferentes tipos de células, entre ellas podemos incluir a la *Echinacea purpurea* (Burguer *et al.*, 1997), *Coriolus versicolor* (Ho *et al.*, 2004), *Illicium verum* (Sung *et al.*, 2012).

LAS PLANTAS COMO FUENTE DE PRINCIPIOS ACTIVOS

La necesidad de promover la búsqueda de medicamentos de origen natural, surge por el incremento en la frecuencia de padecimientos mortales como el cáncer. En términos de tratamiento del cáncer, existen serias limitaciones debido a la falta de selectividad de los agentes quimioterapéuticos y a la resistencia desarrollada por algunas células cancerosas a dichos productos (Setzer y Setzer, 2003), incluyendo la formación de nuevas clonas debido a su inestabilidad genética. Por ello, los compuestos fitoquímicos han sido investigados, proporcionando nuevos recursos para la industria quimioterapéutica (Cordell *et al.*, 1993; Mans *et al.*, 2000). En este contexto surge la necesidad de obtener nuevos principios activos de origen natural que amplíen las opciones farmacológicas y que puedan formar parte de medicamentos alternativos, a partir de la diversidad local (Cadena *et al.*, 2005).

El valor medicinal de las plantas está dado por sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios, que producen efectos fisiológicos y que en la naturaleza tienen la función de defensa química contra la herbivoría, los cuales a menudo muestran una gran complejidad estructural que puede determinar su actividad biológica, dichos compuestos son obtenidos de las plantas por destilación o extracción con disolventes orgánicos; representando un enorme recurso científico y clínico para el desarrollo de nuevos fármacos (Rivera, 2011).

Rzedowski menciona a México como centro de origen y domesticación de diferentes especies cultivadas con una gran cantidad de especies, muchas de ellas semidomesticadas y

abundancia de parientes silvestres (**Rzedowski, 1995; 1995**). Una de las familias botánicas más importantes en las culturas Mesoamericanas por la diversidad de especies incluidas en la dieta y la medicina (por presentar numerosos metabolitos secundarios con potencial farmacológico), son las cucurbitáceas y es en esta familia, donde encontramos al género *Sechium* (**Ortega et al., 1998**).

Género *Sechium* spp.

Dentro de las plantas poco estudiadas se encuentran las especies del género *Sechium* spp., de la familia Cucurbitaceae, llamados comúnmente “chayotes” (**Ortega et al., 1998**). Por muchos años se pensó que *Sechium* spp., era un género monotípico, cuya única especie era *Sechium edule* (Jacq.) Sw., recientemente se acepta que dentro del género hay diez especies, ocho silvestres (*S. compositum*, *S. chinantlense*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, y *S. vilosum*) y dos cultivadas (*S. edule* y *S. tacaco*) con distribución desde México hasta Panamá (**Lira, 1996; Cross, 2003**). Teniendo como una peculiar característica que los frutos silvestres son de sabor amargo y los de las plantas domésticas no (**Lira et al., 1999**).

México presenta la mayor variación morfológica la cual se distingue principalmente en sus frutos con diferentes dimensiones, colores, formas, sabor, ausencia, presencia y densidad de espinas, así como, polimorfismo de hojas (**Cadena-Iñiguez et al., 2008**). Recientemente se han clasificado 10 grupos varietales, con base en caracteres morfoestructurales, fisiológicos, químicos y genéticos de *S. edule* (Jacq.) Sw. (**Cadena-Iñiguez, 2005; Cadena-Iñiguez et al., 2008**).

En estudios realizados con *S. edule* (Jacq.) Sw. se identificaron compuestos como peroxidasas, esteroides, alcaloides, saponinas, fenoles, polifenoles, flavonoides y cucurbitacinas (**Cadena-Iñiguez, 2005**), moléculas a las que se les atribuye actividad anti-alérgica, anti-inflamatoria, anti-oxidantes, antiviral y efectos antitumorales (**Salama et al., 1986; Jayaprakasam et al., 2003; Setzer y Setzer, 2003; Siciliano et al., 2004; Ordoñez et al., 2006**), incluso **Wu et al. (1998)**, caracterizaron a la proteína *sechiumina* del extracto

acuoso de la semilla, la cual tiene propiedades de inactivación ribosomal y podría ser un posible agente quimioterapéutico.

A diferencia de lo que ocurre con otras especies cultivadas, en *Sechium* spp., no existen evidencias arqueológicas o relictos que ayuden a precisar la antigüedad de su origen y manejo. La testa suave de la semilla y su fruto carnoso no permiten su conservación (Lira, 1996). La mayor evidencia de su origen es la existencia de chayotes silvestres en la región centro y sur de México y Centro América. Se considera que el término moderno chayote es una modificación de los vocablos Náhuatl “*huitz ayotl*”, “*chayotl*”, “*chayotli*” lo cual, confirmaría su uso desde tiempos precolombinos (Cook, 1901).

La importancia del género *Sechium* (P. Br.), se ha sustentado en que las especies *S. edule* (Jacq.) Sw. y *S. tacaco* (Pitt.) C. Jeffrey son de importancia alimenticia, ya que los frutos de ambas especies y la raíz de la primera, formaron parte de la dieta de culturas precolombinas (Hernández, 1985; Lira, 1996).

La especie *S. edule* presentan amplia variación morfológica, sobre todo en los tipos introducidos al cultivo. En México se ha identificado la mayor variación de esta especie (Xal, 2001), tanto para cultivados como para silvestres. Las colectas realizadas por Cadena (2001), en dicha región, han mostrado plantas con rasgos morfológicos diferentes principalmente en el tamaño de los frutos, color, forma, sabor amargo y ligeramente dulce, así como también, plantas que presentan polimorfismo en hojas, con diferente coloración en pecíolo, venación y guías.

Otra especie de este género es *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey., se encuentra en algunas partes del sureste de Chiapas y Guatemala, en un rango de altitud que va de 50-2100 msnm, frecuentemente crecen en plantaciones de café, y es conocido como: chayote de caballo. De igual forma, la especie *S. chinantlense* Lira & F. Chiang., es una planta endémica de una pequeña región de México, en el norte de Oaxaca, cerca de Veracruz denominada la Chinantla, se encuentra en áreas con alta humedad y altitudes desde 20 a 800 m; es conocido como: cabeza de chango, chayote cimarrón y chayote de monte (Lira, 1996).

Estudios realizados con frutos, hojas y semillas de chayote han revelado su actividad diurética, anti-inflamatoria (Salama *et al.*, 1986) e hipotensora (Cambar *et al.*, 1980; Guppy *et al.*, 2000), antimutagénica (Yen *et al.*, 2001), antibacteriana (Ordoñez *et al.*, 2003), ayuda a la eliminación de cálculos renales, es utilizado como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión (Abdelnour *et al.*, 2002), alivia la inflamación intestinal y cutánea además de favorecer la cauterización de úlceras (Diré *et al.*, 2003).



Figura 4. Morfología de los frutos de especies del género *Sechium*

- A) *S. edule* var. *Nigrum spinosum*; fruto ovoides con abundantes espinas
- B) *S. chinantlense*; fruto pequeño y redondo
- C) *S. compositum*; fruto ovoide y carece de espinas.

ANTECEDENTES DIRECTOS

En la medicina tradicional se tiene reportado que el té de hojas y frutos de *S. edule* tiene efectos diuréticos, propiedades anti-inflamatorias, se emplea para tratar calculos renales y se utiliza como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión (Lira, 1996; Abdelnour *et al.*, 2002). También se ha reportado el uso de chayote para tratar la inflamación intestinal y cutánea así como en la cauterización de úlceras (Bueno *et al.*, 1970; Lozoya, 1980; Ribeiro *et al.*, 1988; Flores, 1989).

En la investigación biomédica se ha identificado que *S. edule* (Jacq.) Swartz variedad *nigrum spinosum* tiene actividad antitumoral (**Cadena et al., 2007**), datos recientes reconocen que los extractos crudos de *Sechium*: *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *S. chinantlense*, y *S. compositum* inhiben la proliferación de manera diferencial en células leucémicas y normales. A partir de la IC50 establecida para la línea celular WEHI-3 y bajo las mismas condiciones de cultivo, se demostró que los extractos de *Sechium* reducen la proliferación de las células leucémicas sin afectar de manera significativa a las células normales (**Aguiñiga, 2013**), característica poco común en agentes antitumorales.

De manera interesante, empleando las mismas condiciones de cultivo antes mencionadas, se encontró que los extractos de *Sechium*, inducen la fragmentación del ADN en las células leucémicas sin afectar las células normales (**Cadena, 2013**), demostrando que los extractos además de inhibir la proliferación celular, inducen apoptosis en las células leucémicas.

En la investigación, se ha demostrado que la inyección de los extractos crudos de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, *S. chinantlense* y *S. compositum* en ratones, incrementa de manera significativa, el número de células en sangre y el número de células en división (índice mitótico) en la médula ósea de ratones normales, lo que sugiere, estimula la hematopoyesis (**Gómez, 2013**).

En resumen se ha demostrado que la inyección de los extractos aumenta el índice mitótico en células de médula ósea de ratones normales, indicando que aunado a su actividad antitumoral *in vitro*, promueve la hematopoyesis normal *in vivo*. Reconociendo que las citocinas son moduladoras cruciales de la hematopoyesis y que los extractos modulan este evento, es de vital importancia reconocer citocinas promotoras e inhibidoras que participen en la actividad biológica diferencial entre células leucémicas y normales inducidas por los extractos de *Sechium*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se demostró que extractos crudos de *S. edule* (Jacq.) Swartz y de las especies silvestres *S. chinantlense* Lira&Chiang y *S. compositum* (Donn. Sm.) C. Jeff; inhiben la proliferación en forma dependiente de la concentración de la línea leucémica mieloide de ratón WEHI-3, además provoca cambios morfológicos e induce la formación de cuerpos apoptóticos y degradación del ADN (observado en forma de escalera de la muerte) pero sin dañar a células de médula ósea normal, demostrando una actividad antitumoral *in vitro*. Sin embargo, incrementa de manera significativa el número de células en división (índice mitótico) en la médula ósea de ratones normales, lo que sugiere, estimula la hematopoyesis *in vivo*, pero no se conoce si la modulación en la proliferación de líneas leucémicas y normales ejercida por el extracto, tanto *in vitro* como *in vivo*, es mediada por la inducción de citocinas tanto promotoras como inhibidoras.

JUSTIFICACIÓN

La LMA es un tipo de cáncer de la sangre caracterizado por la expansión clonal de progenitores hematopoyéticos en ausencia de diferenciación y maduración terminal. A pesar del avance del conocimiento de las bases celulares y moleculares de la leucemia y su uso en el desarrollo de nuevas terapias, aún no se ha logrado incidir en la tasa de sobrevivencia y remisión de la enfermedad, ya que se reporta que más de la mitad de los pacientes adultos jóvenes y aproximadamente el 90% de los pacientes con mayoría de edad, todavía mueren a causa de esta enfermedad, por ello sigue vigente la necesidad de estudiar nuevas alternativas para el tratamiento de esta neoplasia (**Tallman y Gilliland, 2005; Gregory et al., 2009; Ferrara y Schiffer, 2013**), particularmente de aquellas que promuevan la eliminación de células leucémicas sin dañar a las normales, debido a que desafortunadamente, los agentes quimioterapéuticos, además de eliminar células tumorales, tienen efectos secundarios en tejidos normales como el hematopoyético, reflejado en mielosupresión, problema que limita el propio tratamiento oncológico (**ABTA, 2012**).

Extractos de *Sechium* tienen actividad antiproliferativa y antitumoral para la línea celular leucémica mielomonocítica WEHI-3, un tipo de LMA, pero siendo inocuo para células de médula ósea de ratón *in vitro* e incluso su administración en ratones sanos incrementa la hematopoyesis normal *in vivo*, lo cual sugiere selectividad citotóxica por las células leucémicas, característica que aún no ha sido reportada por ningún fármaco. Considerando que la modulación positiva y negativa de la hematopoyesis es regulada por citocinas, el identificar la presencia de citocinas inhibidoras de la proliferación celular e inductoras de apoptósisis en las células leucémicas, y encontrar citocinas promotoras de la proliferación celular *in vitro* e *in vivo*, se estaría confirmando que el extracto puede promover la eliminación de células leucémicas sin dañar a las normales y se estaría estableciendo la posible ruta de acción de los extractos vía citocinas y con ello se daría un paso con la intención de sentar las bases para el uso de *Sechium spp.* como un agente terapéutico

selectivo para eliminar células tumorales pero no a las normales en pacientes con leucemia, característica anhelada por los médicos oncólogos.

HIPÓTESIS

Se ha mostrado que los extractos crudos de distintas especies del género *Sechium* inducen inhibición de la proliferación y muerte de la línea celular leucémica de ratón WEHI-3, un ejemplo de cáncer de la sangre, siendo inocuo para células de médula ósea de ratón *in vitro*, un ejemplo de hematopoyesis normal, e incluso hay un incremento de ésta cuando se administra a ratones sanos. La modulación positiva y negativa de la hematopoyesis es regulada por citocinas, por lo que se espera que la adición de los extractos de *Sechium* induzca la producción de citocinas inhibidoras de la hematopoyesis en las células leucémicas y citocinas estimuladoras en células normales *in vitro*, e *in vivo*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la administración de los extractos de *S. compositum*, *S. chinantlense*, y *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, inducen alteraciones en la concentración de citocinas en el sobrenadante de cultivo de la línea celular WEHI-3, células mononucleadas de ratón normal y suero de ratones normales tratados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si el tratamiento con los extractos de *Sechium spp.* es capaz de inducir el aumento en la concentración de citocinas involucradas en procesos biológicos como inhibición de la proliferación y apoptosis (TNF- α , INF- γ , MCP-1 e IL-6) en sobrenadantes de cultivo de la línea celular WEHI-3 y sobrenadante de cultivo de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón y suero de ratones sanos tratados.
- Determinar si el tratamiento con los extractos de *Sechium spp.* es capaz de inducir el aumento en la concentración de citocinas promotoras de la hematopoyésis (GM-CSF, M-CSF y G-CSF) en sobrenadante de cultivo de células mononucleadas de ratón normal y suero de ratones normales tratados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de los extractos

Se colectaron frutos de *S. compositum*, *S. chinantlense* y *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* en madurez hortícola (**Watada et al., 1985; Cadena y Arevalo, 2011**), en el Banco Nacional de Germoplasma de *S. edule* (BANGESE), GISEM-CRUO-UACH. Los frutos completos (semillas, epidermis y espinas) fueron lavados, secados, picados en hojuelas, y se secaron a 40°C con circulación de aire hasta su deshidratación completa. Posteriormente fueron macerados para estandarizar el tamaño de la partícula. Empleando 1 kg de fruto seco y molido por cada especie, se sometieron a una extracción sólido-líquido con metanol hasta agotar la muestra, colectando el extracto arrastrado por el disolvente en un matraz, seguido de una evaporación a presión reducida hasta concentrar el extracto (**Cadena et al., 2005**). Los extractos fueron pesados y disueltos en solución fisiológica (PBS), para finalmente ser esterilizados por luz UV (Apéndice I).

Cultivo de la línea celular WEHI-3

Para este trabajo se empleó la línea de leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3 (ATCCRockville, MD, EUA), considerada como uno de los modelos en ratón de mayor valor y uso en el estudio de la leucemia mieloide aguda (**Robinson y Rose, 1992; Dilloo et al., 1997; Park et al., 2002; Wen et al., 2010**), originalmente establecida a partir de cultivo sucesivo de un sarcoma mieloide de ratones BALB/c (**Warner et al., 1969**).

Dentro de sus características está el hecho de que secreta al medio CSA (*colony-stimulating activity*: actividad estimuladora de colonias), lisozima e IL-3. Se sabe que se inhibe su crecimiento en presencia de 4 ng/mL de lipopolisacárido, ó 30-40 g/mL de sulfato de dextrán. Estas células tienen la jerarquía hematopoyética de ser células inmaduras o

progenitoras mielomonocíticas, y es ampliamente empleada para estudios sobre el control de la proliferación y diferenciación de células leucémicas (**Metcalf, 1980**).

Las células fueron cultivadas con IMDM (Iscove's Modified Dubelcco's Medium) (Gibco BRL NY, EUA) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) desactivado (Gibco BRL NY, EUA), adicionando β -mercaptoetanol (0.05 mM) (Sigma-Aldrich, EUA), manteniéndose a 37°C, al 5% de CO² y humedad saturante, con resiembra cada 48 h a una densidad de 30 000 cel/mL (Apéndice I).

Obtención y cultivo de células mononucleadas de médula ósea (CMN-MO)

Se emplearon ratones hembras de 8 a 12 semanas de edad clínicamente sanos de la cepa BALB/c, sacrificados por dislocación cervical, obteniendo los fémures para posteriormente aislar las células mononucleadas. Brevemente: los fémures fueron perforados en ambas epífisis, con una jeringa de 5 mL, se hizo fluir medio IMDM suplementado con SFB al 15% para extraer la células totales de médula ósea, la suspensión celular ser centrifugó para obtener el botón celular. Este fue resuspendido en 2 ml de medio de cultivo Iscove con SFB al 15%. Enseguida se pasaron mediante un método de gradiente de densidad empleando ficoll ($\delta=1.077\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) por 30 minutos a 3000 rpm (Hermie Labortechnik, Germany). Al finalizar este periodo se obtuvo un anillo celular el cual contenía a las células mononucleadas, las cuales fueron extraídas y lavadas dos veces con Iscove y SFB al 15%, para realizar el conteo celular.

Evaluación de la proliferación celular

Para confirmar el efecto de los extractos crudos de las diferentes especies de *Sechium* en la proliferación de la línea celular leucémica WEHI-3, se usó una densidad de 5 000 cel/mL. Las células se mantuvieron en cultivo durante 72 h en placas de 96 pozos fondo plano (Corning NY, USA) en las condiciones ya mencionadas. Se cultivaron en ausencia o presencia de cada uno de los extractos a concentraciones de 0, 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$

para el extracto crudo de *S. compositum* y *S. chinantlense*, y a concentraciones de 0, 40, 230, 470, 1180 y 2370 µg/mL para *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, empleando como controles la adición de PBS como vehículo y 1.2 µg/mL de Ara-C® (citarabina: 1-beta-D-arabinofuranosilcitosina) como control positivo de inhibición de la proliferación.

En el caso de las células monucleadas, estas fueron cultivadas inmediatamente después del procedimiento de obtención antes descrito, en IMDM suplementado con 15% de SFB (Gibco BRL, USA), 5% de suero equino y 5 ng/mL de Interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3), a una densidad de 100,000 cel/mL en placas de 96 pozos (Corning NY, USA). Fueron mantenidas en cultivo durante 48 h para obtener una mayor densidad celular antes de la adición de los extractos, transcurrido ese lapso de tiempo, las células fueron estimuladas a las concentraciones antes establecidas para WEHI-3 y se mantuvo en cultivo durante 72 h más.

La proliferación celular fue evaluada mediante la técnica de cristal violeta modificada por **Kueng** (1989) y originalmente propuesta por **Gillies et al.** (1986). Brevemente, transcurridas las 72 h de incubación bajo el estímulo de los extractos, las células fueron fijadas con 50 µL/pozo de glutaraldehído al 1.1% durante 24 h (Apéndice I). Posteriormente se eliminó el fijador y se adicionó 50 µL/pozo de la solución de cristal violeta al 1% para teñir el núcleo de las células (**Wakelin et al., 1981**) lo cual es un parámetro indirecto para determinar el número celular (**Gilles et al., 1986**). La placa se mantuvo en agitación en un agitador de placas (Red Rotor, Instrumental electrónicas, EUA) durante 5 min, al término de este periodo el colorante no asimilado por las células fue eliminado por lavados con agua destilada. Finalmente el colorante unido a las células se solubilizó con 50 µL/pozo de ácido acético al 10% (Apéndice I) y se dejó agitar la placa 20 min. Posteriormente se evaluó la placa a una densidad óptica de 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan Spectra, Austria) y se graficaron los valores de absorbancia en términos de porcentaje de proliferación de los diferentes estímulos con respecto al control.

Posteriormente, mediante la ecuación de regresión lineal se determinó la concentración necesaria de cada uno de los extractos para disminuir aproximadamente un 50% la

densidad celular (IC_{50}) en la línea celular WEHI-3 y células mononucleadas de médula ósea normal de ratón (CMN-MO) con respecto al vehículo.

Obtención del sobrenadante de cultivos

Las células fueron estimuladas con la IC_{50} de cada uno de los extractos para las células WEHI-3 y CMN-MO: PBS como vehículo, *S. compositum* 0.93 y 1.80 $\mu\text{g/mL}$, *S. chinantlense* 0.3 y 3.56 $\mu\text{g/mL}$, *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* con 803.1 y 1992.9 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y 1.2 $\mu\text{g/mL}$ de Ara-C[®] como control positivo. Finalmente para coleccionar el sobrenadante, y transcurrido el tiempo de estímulo, se coleccionaron las células y el medio de cultivo, para ser centrifugados y así coleccionar el sobrenadante, el cual fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Tratamiento de los ratones y obtención de suero

Ratones hembra BALB/c de 8 a 12 semanas de edad, fueron mantenidos y alimentados *ad libitum*, bajo condiciones estériles y libres de patógenos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Fueron divididos en 5 grupos y cada grupo estuvo conformado por 5 ratones: el grupo control que recibió 1 mL de PBS, un grupo para cada uno de los extractos: los grupos conformados por *S. compositum* y *S. chinantlense* recibieron 1 mL de PBS con una dosis de extracto crudo de 6.6 mg/kg de peso de ratón y el grupo de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* recibió 1 mL de PBS con una dosis del extracto crudo de 790 mg/kg de peso de ratón, finalmente el último grupo de tratamiento recibió 1 mL de PBS con una dosis de citarabina de 3 mg/kg de peso de ratón. Los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal (IP) cada 48 h por 7 días. Transcurridas 2 h después de la última inyección, los animales fueron anestesiado con éter, y se obtuvo la sangre del plexo axilar, posteriormente se centrifugó a 2000 rpm (Hermie Labor Technik, Germany) para obtener el suero y colocarlo en tubos estériles a -20°C hasta su procesamiento.

Detección de citocinas por CBAs

La determinación y cuantificación de las citocinas TNF- α , INF- γ , MCP-1 e IL-6, en el sobrenadante de cultivos y sueros de ratones tratados, se realizó por citometría de flujo mediante CBA (Mouse Inflammation Kit Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences Pharmigen, San Diego, EUA) apegándose al protocolo de uso descrito por el fabricante. Este sistema permite cuantificar en una sola muestra los niveles de las citocinas antes mencionadas por citometría de flujo, a partir de estándares de concentración conocidos (**Kolkowski, 2004**). A continuación se explica brevemente el ensayo:

El sistema de BD citometría de perlas (CBA) emplea un conjunto de diferentes partículas en suspensión con intensidades de fluorescencia diferentes para detectar simultáneamente múltiples analitos solubles en una muestra, tales como citocinas empleando como herramienta un citómetro de flujo. Esta técnica permite la determinación rápida de perfiles de citocinas en pequeños volúmenes de muestra (**Amsen *et al.*, 2009**). Las concentraciones de cada curva y sensibilidad del kit se encuentran de 20 a 5000 pg/mL para cada una de las citocinas.

Cada subconjunto de perlas en suspensión se recubre con diferentes anticuerpos de captura, y tiene una intensidad fluorescente distinta, lo que les permite ser distinguidos. Brevemente, las diferentes poblaciones de perlas de captura se mezclaron, y fueron incubadas con los controles, concentraciones de la curva y muestras, posteriormente se incubaron con anticuerpos de detección conjugados con PE (ficoeritrina) para formar complejos “sándwich”. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron lavadas y leídas en un citómetro de flujo FACSAria II (BD Biosciences, San José, CA, USA), tras realizar el acondicionamiento del aparato con los controles de compensación del kit.

Para el análisis de las muestras se utilizó el software FCAP Array versión 3.0 (BD Biosciences, San José, CA) el cual realizó la conversión de fluorescencia a concentración a partir de la curva estandarizada para cada una de las citocinas.

Detección de citocinas por ELISA

Para la detección de citocinas hematopoyéticas tales como GM-CSF, G-CSF y M-CSF, se emplea la técnica de ELISA. Dentro de los métodos más confiables de inmunodiagnóstico, debido a su fácil manejo, alta sensibilidad y especificidad, se encuentran las pruebas inmunoenzimáticas; la más importante de ellas: ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay), es utilizada para la detección de anticuerpos y antígenos (**Cornejo *et al.*, 2010**).

El ensayo inmunoenzimático ELISA se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que el conjugado antígeno-anticuerpo resultante tenga actividad tanto inmunológica como enzimática pudiendo ser revelada mediante la adición de un sustrato específico que, en contacto con la enzima, producirá un color observable a simple vista y cuantificable por un lector de densidad óptica (**Ruiz y Martínez, 2007**).

Para detectar las citocinas mediante la técnica de ELISA se emplearon los sobrenadantes de cultivo y sueros congelados, señalados previamente. El procedimiento se realizó apegándose al protocolo de los kits de ELISA para GM-CSF (MGM00), G-CSF (MCS00) y M-CSF (MMC00) (R&D Systems, EUA). A continuación se explica brevemente el ensayo:

Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo (tipo "sandwich"). Un anticuerpo policlonal de captura específico para GM-CSF, G-CSF ó M-CSF de ratón fue pre-revestido por el fabricante sobre cada microplaca. Las concentraciones de cada curva y sensibilidad de cada kit varían de la siguiente forma: 7.8 a 500 pg/mL para GM-CSF, 14.1 a 900 pg/mL para G-CSF y 31.2 a 2,000 pg/mL para M-CSF. Las concentraciones de la curva, control, y muestras se pipetearon en los pocillos y cualquier citocina específica del kit de ratón presente, quedó unida por el anticuerpo inmovilizado. Después de lavar para retirar el exceso de lo que no pudo unirse, se añadió un anticuerpo policlonal ligado a enzimas específico para GM-CSF, G-CSF ó M-CSF (dependiendo del kit utilizado) a los pocillos. Después de un lavado para eliminar cualquier reactivo de anticuerpo-enzima no unido, se añadió una solución de sustrato a los pocillos. La reacción enzimática, dio como resultado un producto de color azul que se vuelve amarillo cuando se añadió la solución de parada. Finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro (Tecan Spectra,

Austria). La intensidad del color fue medido en proporción a la cantidad de citocina específica de ratón unida en el paso inicial. Los valores de las muestras se determinan a partir de la curva estándar.

Manejo de datos

Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces de manera independiente por triplicado. Los datos son presentados como media \pm la desviación estándar. Para determinar la diferencia significativa en las pruebas de proliferación se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), con la prueba de Tukey ($p < 0.05$) y para los ensayos de ELISA y CBAs, se probó el medio y suero de al menos tres ensayos independientes con dos repeticiones y se realizó una prueba t de Student ($P < 0.05$) respecto al vehículo para obtener la diferencia significativa de cada ensayo empleando el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 11.0 para Windows 2000.

RESULTADOS

EFFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS DE *Sechium* SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR LEUCÉMICA MIELOMONOCÍTICA DE RATÓN WEHI-3 Y CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN NORMAL

Los extractos crudos de *S. compositum*, *S. chinantlense* y *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* tienen un efecto antiproliferativo *in vitro* sobre la línea celular leucémica WEHI-3 y células mononucleadas de médula ósea de ratón normal.

Para confirmar el efecto negativo de los extractos crudos de las diferentes especies de *Sechium* en la proliferación de la línea celular leucémica WEHI-3, las células se cultivaron en ausencia o presencia de cada uno de los extractos a concentraciones de 0, 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5 y 5 µg/mL para el extracto crudo de *S. compositum* y *S. chinantlense*, y a concentraciones de 0, 40, 230, 470, 1180 y 2370 µg/mL para *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, se mantuvieron durante 72 h usando como control de inhibición de la proliferación celular 1.2 µg/mL de Ara-C®. La evaluación de la proliferación se realizó mediante la tinción con cristal violeta, obteniendo la curva de inhibición de la proliferación.

Debido a que es importante determinar si la actividad de los extractos de *Sechium* se restringe solamente a células leucémicas o también afecta el potencial de células normales, se evaluó el efecto de los extractos sobre la proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratón normal en cultivo *in vitro*, siendo expuestas o no a las concentraciones empleadas en la línea celular WEHI-3 para cada uno de los extractos.

Los resultados muestran que el extracto crudo de *S. compositum* inhibe la proliferación en forma dependiente de la concentración en la línea celular leucémica WEHI-3 y en células mononucleadas de médula ósea de ratón normal *in vitro* (Figura 5), teniendo efecto antiproliferativo significativo a partir de 0.15 µg/mL para las células leucémicas, mientras

que para las células normales, se muestra a partir de 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; en comparación el Ara-C redujo en más del 80% la proliferación de ambos cultivos celulares.

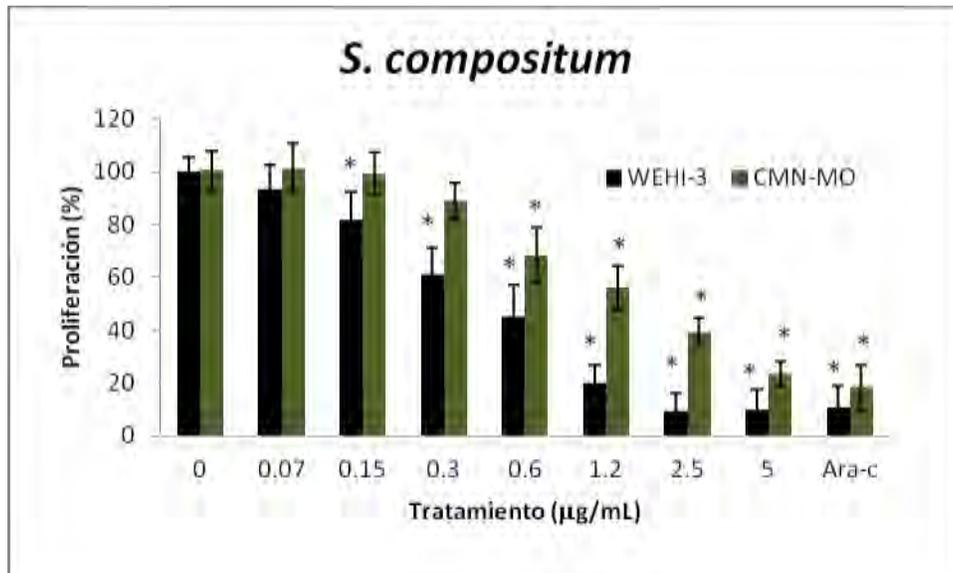


Figura 5. Efecto antiproliferativo inducido por el extracto de *S. compositum*, sobre la línea celular WEHI-3 y CMN-MO. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo (0), 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto. Se incluye Ara-C (1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como control de inhibición de la proliferación. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. *Diferencia significativa contra su respectivo control (ANOVA Tukey $p < 0.05$).

Para el extracto de *S. chinantlense* los datos obtenidos muestran que a partir de 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto, hay un efecto antiproliferativo significativo tanto en la línea celular mielomonocítica WEHI-3, como en células mononucleadas de médula ósea de ratón normal. Es importante resaltar que a partir de esta concentración en la línea celular WEHI-3, la proliferación celular se abate, alcanzando una reducción de más del 90% en la concentración más alta que corresponde a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto, mientras que a esta misma concentración, la proliferación de las células mononucleadas de médula ósea de ratón normal se muestra reducida en menos del 60% con respecto al control (Figura 6).

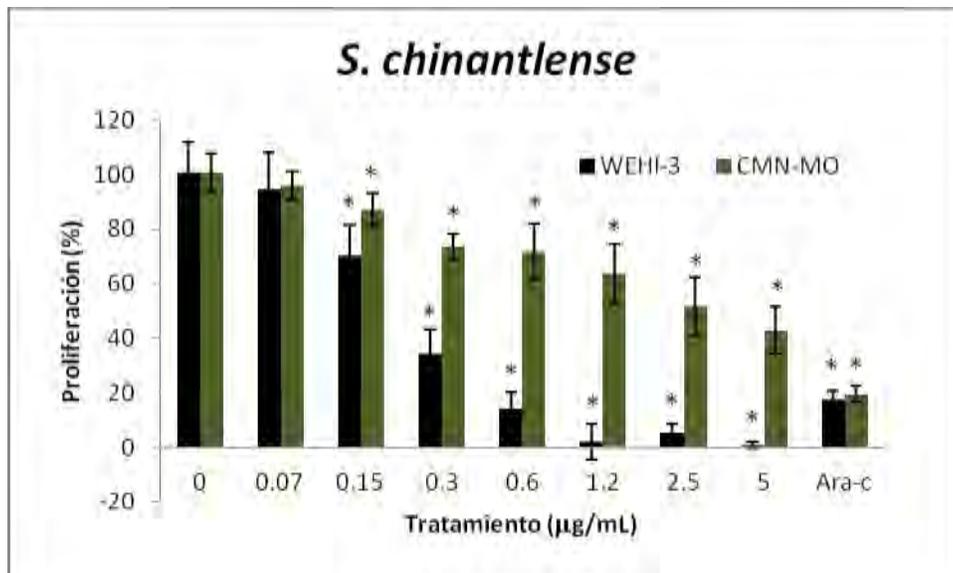


Figura 6. Efecto antiproliferativo inducido por el extracto de *S. chinantlense*, sobre la línea celular WEHI-3 y CMN-MO. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo (0), 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, y 5 µg/mL de extracto. Se incluye Ara-c (1.2 µg/mL) como control de inhibición de la proliferación. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. *Diferencia significativa contra su respectivo control (ANOVA Tukey $p < 0.05$).

En el caso del extracto de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, la diferencia significativa del efecto antiproliferativo se muestra a partir de 230 µg/mL del extracto para la línea celular leucémica WEHI-3, mientras que dicho efecto en células mononucleadas es a partir de 1180 µg/mL, mostrando que a esta concentración para las células leucémicas, logra abatimiento de la proliferación celular en más del 80%, efecto casi comparable con Ara-C (Figura 7).

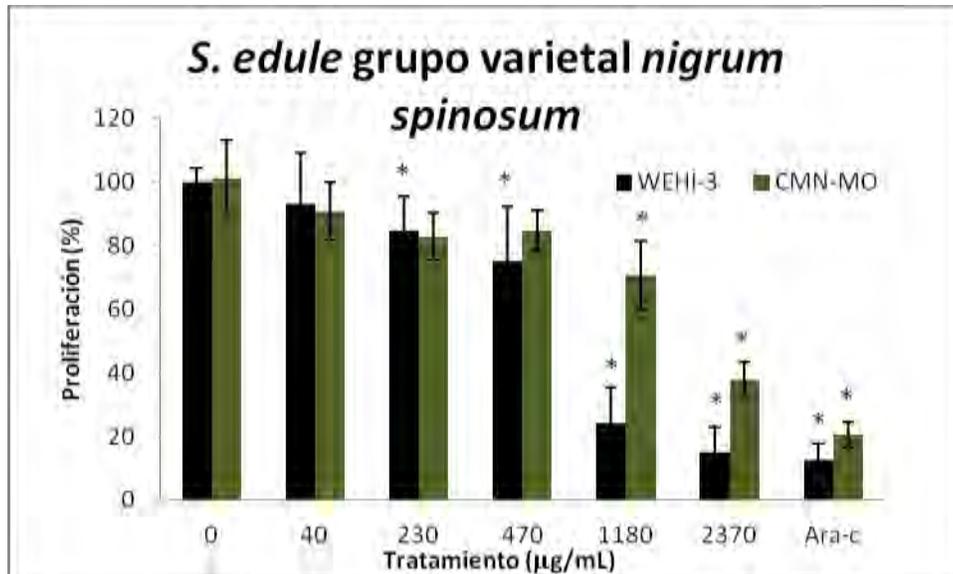


Figura 7. Efecto antiproliferativo inducido por el extracto de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum*, sobre la línea celular WEHI-3 y CMN-MO. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo (0), 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.5, y 5 µg/mL de extracto. Se incluye Ara-c (1.2 µg/mL) como control de inhibición de la proliferación. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. *Diferencia significativa contra su respectivo control (ANOVA Tukey $p < 0.05$).

Determinación de las concentraciones de los extractos de *Sechium*, requeridas para disminuir en un 50% la densidad celular (IC₅₀) en la línea celular leucémica WEHI-3 y células mononucleadas de médula ósea de ratón normal

En las gráficas anteriores se muestran las curvas de inhibición de la proliferación celular en forma dependiente de la concentración sobre la línea celular leucémica WEHI-3 y células mononucleadas de médula ósea de ratón normal, tratadas con los diferentes extractos de *Sechium*. En base a las gráficas se obtuvo la ecuación de regresión lineal que permitió obtener el valor de la recta y con ellas determinar los valores de concentración que indican decremento aproximado del 50% en la densidad celular (IC₅₀) (Tabla 2) (Apéndice II).

Tabla 2. Valores de IC₅₀

	IC50 µg/mL	
	WEHI-3	CMN-MO
<i>S. compositum</i>	0.93 ± 0.50	1.80 ± 0.03
<i>S. chinantlense</i>	0.30 ± 0.03	3.53 ± 0.19
<i>S. edule</i>	803.17 ± 91.10	1992.90 ± 255.48

IC₅₀ de los extractos de *Sechium* sobre la línea celular leucémica WEHI-3 y CMN-MO de ratón normal, calculada en base a la curva dosis-respuesta y obtenida a partir de una ecuación de regresión lineal. Los valores son el promedio de tres ensayos con tres repeticiones. ± Desviación estándar.

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Sechium* EN LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Una vez determinado el efecto antiproliferativo y con el fin de detectar las posibles citocinas responsables de la inhibición de la proliferación celular, se evaluaron los niveles de algunas de las citocinas de mayor importancia, empleando la IC₅₀ para cada uno de los extractos en cultivos de la línea celular leucémica WEHI-3 y CMN-MO de ratón normal, transcurridas 72 h de incubación se obtuvo el sobrenadante de los cultivos para su evaluación.

Debido a que los datos anteriores sugieren efecto diferencial de los extractos de *Sechium* sobre la línea celular WEHI-3 y células de médula ósea normal, afectando en mayor medida a las células leucémicas, se consideró relevante determinar el efecto de los extractos en un modelo *in vivo*, por lo que se empleó el modelo descrito por **Gómez** en el **2013**, en el cual, se administraron diferentes dosis de los extractos de *S. compositum*, *S. chinantlense* y *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* con el fin de determinar alteraciones en los parámetros bioquímicos y hematológicos en ratones sanos. Para este ensayo, se emplearon ratones hembra de la cepa Balb/c y al término del tratamiento se obtuvo el suero de la sangre periférica, para su evaluación.

El tratamiento con extractos de *Sechium spp.*, induce la alteración de los niveles de citocinas inhibitoras de la proliferación como TNF- α , INF- γ , MCP-1 e IL-6 *in vitro* e *in vivo*.

Se evaluó si el tratamiento con los diferentes extractos de *Sechium* era capaz de inducir alteraciones en la concentración de citocinas involucradas en la inhibición de la proliferación celular como TNF- α , INF- γ , MCP-1 e IL-6. Los resultados muestran que tras la evaluación de estas citocinas mediante la técnica de CBAs (Apéndice II), TNF- α se aumenta de manera significativa en sobrenadantes de cultivos de la línea celular WEHI-3 para los extractos de *S. compositum* y *S. chinantlense*, mientras que para el cultivo de células mononucleadas de médula ósea de ratones sanos, esta citocina muestra decremento

significativo al igual que en el suero de ratones tratados con los diferentes extractos de *Sechium* con respecto al control (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles de TNF- α

Tratamiento	TNF- α (pg/mL)		
	WEHI-3	CMN-MO	SUERO
Control	0.40 \pm 0.40	89.79 \pm 5.44	5.02 \pm 0.00
<i>S. compositum</i>	7.26 \pm 0.32 *	37.57 \pm 1.75 *	2.73 \pm 0.34 *
<i>S. chinantlense</i>	2.69 \pm 1.03 *	40.38 \pm 3.16 *	0.83 \pm 0.83 *
<i>S. edule</i>	1.23 \pm 0.43	63.48 \pm 8.60 *	0.83 \pm 0.83 *
Ara-C	1.93 \pm 1.13	3.38 \pm 0.99 *	3.73 \pm 0.00 *

Determinación de los niveles de concentración de TNF- α mediante la técnica de CBAs en sobrenadante de cultivo de la línea celular WEHI-3, cultivo de CMN-MO y suero de ratones tratados con los extractos de *Sechium*. Control con vehículo 1mL PBS y Ara-C. *Diferencia significativa con respecto al control (t de Student $P \leq 0.05$).

Con respecto a INF- γ los niveles son indetectables para el cultivo de la línea celular WEHI-3 y células mononucleadas de médula ósea normal, sin embargo, en el suero de los ratones tratados con los extractos de *Sechium*, solo *S. compositum* y *S. chinantlense* reducen los niveles de manera significativa con respecto al control (Tabla 4).

Tabla 4. Niveles de INF- γ

Tratamiento	INF- γ		
	WEHI-3	CMN-MO	SUERO
Control	0.00	0.00	0.93 \pm 0.08
<i>S. compositum</i>	0.00	0.00	0.26 \pm 0.03 *
<i>S. chinantlense</i>	0.00	0.00	0.00 *
<i>S. edule</i>	0.00	0.00	2.36 \pm 2.36
Ara-C	0.00	0.00	0.66 \pm 0.59

Determinación de los niveles de concentración de INF- γ mediante la técnica de CBAs en sobrenadante de cultivo de la línea celular WEHI-3, cultivo de CMN-MO y suero de ratones tratados con los extractos de *Sechium*. Control con vehículo 1mL PBS y Ara-C. *Diferencia significativa con respecto al control (t de Student $P \leq 0.05$).

Los niveles de la citocina MCP-1 en el sobrenadante de la línea celular WEHI-3 muestran aumento en su concentración de manera significativa en todos los tratamientos con respecto al control, en tanto que en el sobrenadante de cultivos de células mononucleadas de médula ósea todos muestran diferencia significativa con respecto al control pero solo *S. compositum* aumenta los niveles, mientras que los demás tratamientos los reducen. Por otra parte, en el suero de los ratones tratados, *S. compositum* y Ara-C aumentan de manera significativa los niveles de MCP-1 mientras que *S. chinantlense* y *S. edule* los reduce de manera significativa con respecto al control (Tabla 5).

Tabla 5. Niveles de MCP-1

Tratamiento	MCP-1		
	WEHI-3	CMN-MO	SUERO
Control	1.78 ± 1.78	164.67 ± 1.83	16.31 ± 0.99
<i>S. compositum</i>	5.63 ± 0.29 *	258.00 ± 13.67 *	22.71 ± 0.00 *
<i>S. chinantlense</i>	6.53 ± 0.00 *	17.97 ± 2.00 *	14.02 ± 1.30 *
<i>S. edule</i>	5.64 ± 0.89 *	52.69 ± 12.22 *	12.09 ± 0.00 *
Ara-C	5.34 ± 1.18 *	2.87 ± 1.87 *	36.85 ± 0.72 *

Determinación de los niveles de concentración de MCP-1 mediante la técnica de CBAs en sobrenadante de cultivo de la línea celular WEHI-3, cultivo de CMN-MO y suero de los ratones tratados con los extractos de *Sechium*. Control con vehículo 1mL PBS y Ara-C. *Diferencia significativa con respecto al control (t de Student P≤0.05).

En el caso de la Interleucina 6, los niveles se encuentran elevados significativamente para *S. compositum* y *S. chinantlense* en el sobrenadante de la línea celular WEHI-3, así como en el sobrenadante de cultivos de células de médula ósea normal, por el contrario *S. edule* y Ara-C se reducen. En el suero de los ratones tratados, los niveles se aumentan de manera significativa con respecto al control en todos los tratamientos (Tabla 6).

Tabla 6. Niveles de IL-6

Tratamiento	IL-6		
	WEHI-3	CMN-MO	SUERO
Control	0.20 ± 0.20	75.43 ± 0.78	1.32 ± 0.08
<i>S. compositum</i>	4.50 ± 0.28 *	594.64 ± 3.17 *	10.51 ± 0.32 *
<i>S. chinantlense</i>	1.24 ± 0.00 *	123.85 ± 4.79 *	3.40 ± 0.09 *
<i>S. edule</i>	0.33 ± 0.08	57.10 ± 9.29 *	4.78 ± 0.00 *
Ara-C	0.20 ± 0.20	0.41 ± 0.33 *	9.15 ± 0.41 *

Determinación de los niveles de concentración de IL-6 mediante la técnica de CBAs en sobrenadante de cultivo de la línea celular WEHI-3, cultivo de CMN-MO y suero de ratones tratados con los extractos de *Sechium*. Control con vehículo 1mL PBS (Control) y Ara-C. *Diferencia significativa con respecto al control (P≤0.05).

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *Sechium* EN LA ALTERACIÓN DE CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA MIELOPOYESIS

Una vez evaluado el efecto de los extractos de *Sechium* en la alteración de los niveles de concentración de citocinas involucradas en la inhibición de la proliferación, se tuvo como objetivo el observar si bajo el modelo de tratamiento ya reportado, los extractos también podrían tener algún efecto en la hematopoyesis.

El tratamiento con extractos de *Sechium spp.*, induce la expresión de citocinas promotoras de la hematopoyesis como GM-CSF *in vitro*, G-CSF y M-CSF *in vivo*.

Se evaluó si el tratamiento con los diferentes extractos de *Sechium* era capaz de inducir el incremento en la concentración de citocinas involucradas en la granulopoyesis, como el GM-CSF y el G-CSF, y en la monocitopoyesis, como el M-CSF, los cuales son factores estimuladores clave de cada linaje. Los resultados muestran que tras la evaluación de estas citocinas mediante la técnica de ELISA (Apéndice II), en sobrenadantes de cultivos de células mononucleadas de médula ósea de ratones sanos, cultivos de células de leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3 y suero de ratones tratados, se observa que en cuanto al cultivo de células mononucleadas de médula ósea de ratones sanos, *S. edule* grupo varietal

nigrum spinosum, es el único que presenta diferencia significativa con al incrementar la concentración de los niveles de GM-CSF, mientras que los niveles de esta citocina en células WEHI-3 y suero de ratones, es indetectable, debido a su expresión escasa o nula (Tabla 7).

Tabla 7. Niveles de GM-CSF

Tratamiento	GM-CSF (pg/mL)		
	WEHI-3	CMN-MO	SUERO
Control	0.00	1.56 ± 0.53	0.00
<i>S. compositum</i>	0.00	3.56 ± 0.45 *	0.00
<i>S. chinantlense</i>	0.00	5.38 ± 2.56 *	0.00
<i>S. edule</i>	0.00	8.65 ± 1.63 *	0.00
Ara-C	0.00	5.53 ± 1.04 *	0.00

Determinación de los niveles de concentración del GM-CSF mediante la técnica de ELISA en sobrenadante de cultivo de la línea celular WEHI-3, cultivo de CMN-MO y suero de ratones tratados con los extractos de *Sechium*. Control con vehículo 1mL PBS y Ara-C. *Diferencia significativa con respecto al control (t de Student P≤0.05).

En cuanto a G-CSF, se observa que existe incremento en la concentración de los niveles de esta citocina en el suero de los ratones tratados con los extractos de *S. compositum*, *S. chinantlense*, *S. edule* y Ara-C. Los resultados obtenidos para M-CSF muestran que sus niveles aumentan considerablemente con respecto al control en el suero de ratones tratados con los diferentes extractos de *Sechium*, mientras que ambas citocinas no son detectadas en el sobrenadante de cultivo de células de médula ósea, ni en el sobrenadante de la línea celular WEHI-3 (Tabla 8 y 9).

Tabla 8. Niveles de G-CSF

Tratamiento	G-CSF (pg/mL)		
	WEHI-3	CMN-MO	SUERO
Control	0.00	0.00	434.44 ± 55.25
<i>S. compositum</i>	0.00	0.00	2157.02 ± 26.28 *
<i>S. chinantlense</i>	0.00	0.00	1158.76 ± 43.64 *
<i>S. edule</i>	0.00	0.00	1166.70 ± 48.16 *
Ara-C	0.00	15.33 ± 3.72 *	872.70 ± 28.48 *

Determinación de los niveles de concentración del G-CSF mediante la técnica de ELISA en sobrenadante de cultivo de la línea celular WEHI-3, cultivo de CMN-MO y suero de ratones

tratados con los extractos de *Sechium*. Control con vehículo 1mL PBS y Ara-C. *Diferencia significativa con respecto al control (t de Student $P \leq 0.05$).

Tabla 9. Niveles de M-CSF

Tratamiento	M-CSF (pg/mL)		
	WEHI-3	CMN-MO	SUERO
Control	0.00	69.96 ± 0.58	956.96 ± 30.37
<i>S. compositum</i>	0.00	0.00	1448.22 ± 105.13 *
<i>S. chinantlense</i>	0.00	0.00	1798.99 ± 220.93 *
<i>S. edule</i>	0.00	0.00	1359.45 ± 104.46 *
Ara-C	0.00	0.00	1292.03 ± 88.44 *

Determinación de los niveles de concentración del M-CSF mediante la técnica de ELISA en sobrenadante de cultivo de la línea celular WEHI-3, cultivo de CMN-MO y suero de ratones tratados con los extractos de *Sechium*. Control con vehículo 1mL PBS y Ara-C. *Diferencia significativa con respecto al control (t de Student $P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

A pesar del avance en el conocimiento de la biología celular, molecular y bioquímica aplicada al tratamiento de la LMA, esta enfermedad tiene la tasa de supervivencia más baja de todas las leucemias (**Robak y Wierzbowska, 2009**). La quimioterapia y la radioterapia, los tratamientos convencionales utilizados hoy en día, son costosos y causan muchos efectos secundarios, tales como vómitos, alopecia, diarrea, estreñimiento, y los más importantes, como la mielosupresión, toxicidad neurológica, cardíaca, pulmonar y renal, en consecuencia todos estos efectos secundarios no solo reducen la calidad de vida, sino que la mayoría de los pacientes mueren a causa de la enfermedad (**Mans et al., 2000; Stone et al., 2004**).

Aproximadamente el 60% de los medicamentos que se utilizan para el tratamiento del cáncer se han aislado a partir de productos naturales (**Gordaliza, 2007**) siendo el reino de las plantas la fuente más significativa. Se han reportado 16 nuevos compuestos derivados de plantas que se están probando en ensayos clínicos y de éstos, 13 se están probando en fase I o II, y 3 están en fase III. Entre estos compuestos se encuentra el flavopiridol, aislado del árbol *Dysoxylum binectariferum* y el mesoindigo, aislado de la planta china *Indigofera tinctoria*, los cuales han demostrado que presentan efectos anti-cáncer con menor toxicidad que los fármacos convencionales (**Saklani y Kutty, 2008**). Es conocido que el interés de un agente potencial anti-cancerígeno, no sólo depende de su actividad hacia las células malignas, sino de su falta de toxicidad para los tejidos normales (**Lickliter et al., 2003**).

En este trabajo se confirma que extractos crudos de frutos de *S. compositum*, *S. chinantlense* y *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* inhiben la proliferación en forma dependiente de la concentración en la línea celular de leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3 y de células mononucleadas. En todos los casos se observó que la IC₅₀ para células mononucleadas de médula ósea fue mayor que para las leucémicas, estos datos corresponden al efecto reportado anteriormente, donde la IC₅₀ de *S. edule* (Jacq) Sw. es mayor a 400 µg/mL en la línea celular macrofágica de ratón P388 (**Salas y Torres, 2007**),

mientras que especies silvestres como *S. compositum* y *S. chinantlense* mantienen una IC₅₀ en esta línea celular de 2.75 y 2.32 µg/mL respectivamente, lo cual indica que los extractos silvestres son por lo menos 150 veces más potentes que los provenientes de *S. edule*, una especie domesticada (Tiburcio, 2011). Estos datos indican que las células leucémicas, son doblemente sensibles al extracto que las normales, lo cual sugiere una posible selectividad citotóxica para las células tumorales, una característica que no conservan muchos antineoplásicos (Vega *et al.*, 2006) y constituye una ventana de sensibilidad tumoral versus células normales nada despreciable en una terapia antitumoral.

Este efecto diferencial entre especies de *Sechium*, es debido probablemente a que los frutos de las especies silvestres presentan mayor cantidad de metabolitos tales como flavonoides y flavonas, que son de gran importancia en la farmacología ya que se les atribuyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antivirales, antimutagénicas y anticancerígenas (Hirano *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001; Benito *et al.*, 2002; Sen *et al.*, 2002; Aguiñiga, 2013). Además del contenido de curcubitacinas, que se encuentran en mayor cantidad en las especies silvestres y son las probables responsables del sabor amargo en los frutos, ya que en *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* en su estatus de variante domesticada muestra bajos valores y carece de dicho sabor, las curcubitacinas son de interés biomédico, ya que se ha descrito su actividad citotóxica en células tumorales a muy bajas concentraciones (Setzer y Setzer, 2003; Cadena-Iñiguez, 2005).

El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos establece que los extractos crudos con IC₅₀ menor a 20 µg/mL son agentes con potencial anticancerígeno, lo que resalta el potencial antiproliferativo de los extractos de *S. compositum* y *S. chinantlense* con una IC₅₀ de 0.93 y 0.30 µg/mL respectivamente, ya que no solo se encuentran en este rango, sino que incluso cumplen el mismo criterio de interés oncológico como si se trataran de moléculas puras, cuyo nivel de IC₅₀ es menor a 5 µg/mL (Boik, 2001). No obstante, también se debe tener presente, que una disminución en la proliferación de cualquier tipo de célula puede ser consecuencia de citotoxicidad del compuesto de interés (Freshney, 1994), por lo que en oncología, la eficacia de los fármacos antitumorales es relacionada además con su capacidad para inducir apoptosis (Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

El grupo de trabajo de Hematopoyesis y Leucemia de la FES-Zaragoza, demostró que extractos crudos de *S. compositum*, *S. chinantlense* y *S. edule*, no solo inhibían la proliferación de las líneas leucémicas mieloides de ratón P388, J774 y WEHI-3, sino que además de disminuir la viabilidad celular, inducían la formación de cuerpos apoptóticos, y promovían la fragmentación del ADN (**Cadena, 2013; Aguiñiga, 2013**), ambas evidencias consideradas como pruebas de excelencia para la detección de apoptosis (**Taylor et al., 2008; Guimaraes et al., 2012**). Por otro lado, en un modelo experimental *in vivo*, la administración de los extractos no mostró tener un efecto tóxico en órganos al no alterar los índices esplénico, hepático y tímico en ratones sanos, sino por el contrario, aumentó el índice mitótico de médula ósea, proponiendo una posible actividad inmunoestimulante (**Gómez, 2013**).

En este sentido, la hematopoyesis involucra la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas (**Metcalf, 1999**), eventos regulados principalmente por interleucinas y factores de crecimiento hematopoyético (**Barreda et al., 2004**). Es conocido que este conjunto de factores modula positiva y negativamente la hematopoyesis. La regulación de la proliferación celular no está restringida a la familia de las citocinas, no obstante, se les ha atribuido un mayor espectro de actividades biológicas, destacando la promoción de la diferenciación celular, la inducción de la proliferación celular y la inhibición del crecimiento en células tumorales (**Nathuan y Sporn, 1991; Mire y Thorpe, 1998**).

Así, para evaluar los posibles responsables de la inhibición de la proliferación y muerte celular, se evaluaron los niveles de TNF- α , el cual se ha considerado como un agente anti-cáncer desde su descubrimiento hace dos décadas. Miembros de la familia de TNF- α juegan un papel importante en diversos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la modulación de la respuesta inmune y la inducción de la inflamación (**Kawasaki et al., 2002**). TNF- α se expresa primordialmente por macrófagos y monocitos, pero también es expresada por neutrófilos, células NK, mastocitos, células endoteliales y linfocitos activados (**Bedoui et al., 2005; Croft, 2009**).

Para la línea celular de leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3, la literatura reporta que tiene la capacidad de secretar al medio CSA (colony-stimulating activity), lisozima (LZM) e interleucina-3 (IL-3) y es inhibida por la presencia de LPS (**Ralph et al., 1976, 1977; Metcalf, 1980; Lee et al., 1982**), estas células tienen la jerarquía hematopoyética de ser células inmaduras o progenitoras mielomonocíticas, y es ampliamente empleada para estudios sobre el control de la proliferación y diferenciación de células leucémicas (**Metcalf, 1980**), inclusive, resultados del equipo de trabajo revelan los niveles de TNF- α en dicha línea celular, sin inducir su producción al ser tratadas con caseinato de sodio (CasNa) una proteína de la leche y fuerte inhibidor de la proliferación celular en WEHI-3 (**Ledesma et al., 2005**). En contraste, en este trabajo se detectan niveles basales, casi indetectables de esta citocina y se observa que el tratamiento con extractos de *Sechium*, inducen su producción, lo que explicaría la inhibición de la proliferación, sugiriendo que la acción es mediada por la molécula de TNF- α , un reconocido inductor de la muerte celular, que inclusive puede inducir apoptosis (**Giora et al., 1992; Boing et al., 1998**), este efecto biológico coincide con lo reportado para otra línea celular tumoral L929 (fibrosarcoma de pulmón) (**Humphreys y Wilson, 1999**).

Por el contrario, en cultivos de CMN-MO de ratón, y suero de ratones tratados con los extractos de *Sechium*, los niveles de esta citocina no aumentan, sino se reducen de manera significativa hasta en un 50%, de esta forma podría explicarse la selectividad de los extractos entre ambos tipos celulares, induciendo a las células tumorales a apoptosis y no así a las células normales de médula ósea, tejido altamente sensible a los tratamientos para combatir la leucemia (**Aguíñiga, 2013**), cabe resaltar que el efecto mejor estudiado del TNF- α al liberarse en forma sistémica, es la inducción del choque séptico, que se origina cuando niveles elevados de TNF son liberados a la circulación, provocando activación endotelial masiva, asociada al desarrollo del síndrome de daño orgánico múltiple que suele conducir a la muerte (**Esquivel, 2007**), por lo que el tratamiento continuo con extractos de *Sechium*, parece no conducir a una respuesta negativa en individuos sanos, dilucidando que en este sentido, no causaría daños en pacientes bajo tratamiento.

Los niveles de INF- γ , no fueron detectados en el sobrenadante de la línea celular WEHI-3, ni en cultivo de CMN-MO, su evaluación se empleo debido a que se ha descrito que las células presentadoras de antígeno tienen la capacidad de generar INF- γ pero su principal fuente son los linfocitos activados, Th1 (CD4+), T (CD8+) y en menor grado por células NK (**Abbas y Lichtman, 2003**). Ambos cultivos de nuestro modelo de estudio están compuestos mayoritariamente por células de linaje mieloide: blastos, granulocitos y monocitos en el caso de la línea celular WEHI-3 y mieloblastos, granulocitos, monocitos y linfocitos para el cultivo de CMN-MO (**Ramos, 2004; Domínguez, 2012**) que pertenecen al mismo linaje que los macrófagos, células reconocidas como presentadoras de antígeno.

Por otro lado, en la evaluación sobre el suero de ratones tratados con los extractos, no hay una diferencia significativa con respecto al control e incluso *S. compositum* y *S. chinantlense* parecen reducir los niveles de dicha citocina, lo que nos sugiere un método adecuado y libre de patógenos en la preparación y administración de los extractos, ya que diversos agentes pueden inducir la síntesis y secreción de IFN, como los virus que son fuertes potenciadores, seguidos de las infecciones por bacterias, micoplasmas y protozoos, inclusive ciertas citocinas, factores de crecimiento y factores estimuladores de colonias (**Aguirre et al., 2002**).

Es conocido que las citocinas presentan regulaciones positivas y negativas entre sí y por lo general no actúan solas, sino con otras citocinas producidas por la misma célula, pudiendo inducir, potenciar o inhibir la producción de otras citocinas (**Aguirre et al., 2002**), por esta razón consideramos importante la evaluación de citocinas que por la naturaleza de nuestros modelos de estudio, pudieran estar presentes, e incluso actuar sinérgicamente en los efectos biológicos ya reportados.

Por lo anterior se evaluó a la quimiocina MCP-1, su nombre proviene de su función quimiotáctica y tiene un papel crítico como iniciadora y promotora de las reacciones inflamatorias, ya que regula el tráfico y afluencia al sitio de inflamación de varios tipos celulares leucocitarios y es secretada principalmente por monocitos, macrófagos y células dendríticas (**Carr et al., 1994; Xu et al., 1996; Aguirre et al., 2002; Craig y Loberg, 2006**). Se

ha reportado que la expresión de MCP-1 puede ser inducida después de la interacción con estímulos inflamatorios, incluyendo los virus, LPS, y algunas citocinas como TNF- α , IL-1, INF- γ , entre otras (Luo *et al.*, 1994; Luster y Rothenberg, 1997), este hecho coincide con los niveles de MCP-1 y TNF- α en el sobrenadante de la línea celular WEHI-3, donde los niveles de ambas citocinas se elevaron en los tratamientos con los extractos de *Sechium*, reforzando esta idea, el equipo de trabajo ha demostrado que el tratamiento con extractos de *Sechium* inducen a las células WEHI-3 a muerte por apoptosis y no así a las células normales (Aguíñiga, 2013), en este contexto la literatura reporta que en un modelo de microambiente tumoral, MCP-1 mostró una actividad antiproliferativa e incluso proapoptótica directa de monocitos hacia células de cáncer pancreático, donde también se vio involucrada la citocina TNF- α , induciendo apoptosis y mostrando una reducción de la tasa de proliferación de cáncer de páncreas, en síntesis, proponen a dichas citocinas como un posible regulador negativo de la progresión del cáncer (Monti *et al.*, 2003).

En el sobrenadante de cultivos de células mononucleadas de médula ósea todos los tratamientos muestran bajar los niveles de MCP-1 de manera significativa, a excepción de *S. compositum* que los aumenta, mientras que al ser evaluados en el suero de los ratones tratados, se observa que *S. compositum* y Ara-C aumentan de manera significativa a MCP-1 mientras que *S. chinantlense* y *S. edule* reduce significativamente los niveles detectados con respecto al control. Los resultados obtenidos para células normales y ratones sanos llaman la atención, debido a que en los últimos años la sobre-expresión de esta quimiocina ha sido asociada a muchas condiciones patológicas tales como enfermedades cardiovasculares, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, entre otras, así como su importante papel en la vigilancia inmune de rutina, la modulación inmune, y especialmente en la limpieza de infecciones virales agudas (Deshmane *et al.*, 2009).

Considerando que TNF- α es una citocina involucrada en la cascada de señalización para la activación de MCP-1, los resultados tanto *in vitro* como *in vivo* para *S. compositum* no pueden ser concluyentes, por lo que valdría la pena analizar algunas otras citocinas proinflamatorias como IL-1, la cual podría desempeñar un papel importante en la iniciación

de la cascada (**Milligan et al., 2003; Deshmane et al., 2009**). La reducción en los niveles de MCP-1, parecería ser beneficioso en algunas de las condiciones patológicas mencionadas anteriormente, sin embargo se debe sopesar cuidadosamente debido a su papel en el mantenimiento de la salud y debe considerarse que el reclutamiento de monocitos/macrófagos en un órgano en particular en respuesta a la inflamación, es una función vital para eliminar los patógenos invasores a través de la fagocitosis (**Deshmane et al., 2009**).

Es conocido que el TNF- α favorece la producción y liberación de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 (**Cova, 2006**), por lo que esta citocina también fue evaluada. IL-6, es una citocina con un amplio rango de actividades biológicas al ser una conocida como multifuncional, ya que tiene acciones inflamatorias como antiinflamatorias (**Choy, 2004**) es producida por una gran variedad de células, fundamentalmente por monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea, puede ser inducida por IL-1 y TNF- α de fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, astrositos, células B, T y otras, además es inhibida por los glucocorticoides. Actúa como regulador de la actividad inmunológica, la reacción de fase aguda, oncogénesis, inflamación y hematopoyesis (**Díaz, 2007; González, 2008; Figueroa, 2010**).

En la evaluación de los niveles de esta citocina en el sobrenadante de la línea celular WEHI-3, los niveles se encontraron elevados con respecto al control, probablemente debido a que la producción de IL-6 por monocitos puede inducirse por la acción de TNF- α (**Díaz, 2007**), inclusive los resultados sugieren que la cantidad de IL-6 en el sobrenadante es proporcional a la cantidad de TNF- α , ya que *S. compositum* y *S. chinantlense* mostraron niveles de TNF- α de 7.26 y 2.69 pg/mL y para IL-6 de 4.5 y 1.24 pg/mL respectivamente, mientras que *S. edule* y Ara-C mostraron niveles más bajos de TNF- α con 1.23 y 1.93 pg/mL y para IL-6 de 0.33 y 0.20 pg/mL, disminución que se refleja en una diferencia significativa solo para *S. compositum* y *S. chinantlense*. Después de la evaluación en el sobrenadante de cultivos de células mononucleadas de médula ósea estas dos especies se elevan de manera significativa con respecto al control, por el contrario *S. edule* y Ara-C se reducen; en el suero de los

ratones tratados, los niveles se aumentan de manera significativa con respecto al control en todos los tratamientos.

Conocer el rol de esta citocina en células normales es algo confuso, debido a que como ya se ha descrito, se considera como pleiotrópica, en el peor de los casos, se le relaciona con enfermedades que se acompañan de un proceso inflamatorio crónico en el que la producción de citocinas como IL-1, TNF- α e IL-6 se encuentra excesivamente elevadas y fuera de control, aunque por el momento todavía se discute si los macrófagos son los responsables de la aparición de la enfermedad o si su actividad descontrolada es una consecuencia de esta (**Cremer *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Ross y Auger, 2002; Kishimoto, 2005**), sin embargo, al no encontrar niveles elevados de TNF- α en el suero de los ratones tratados con los extractos, nos lleva a pensar que el papel de esta citocina tras el estímulo es favoreciendo la hematopoyesis, resultado reflejado en el aumento de células en división de la médula ósea (**Gómez, 2013**). En este contexto la literatura reporta que IL-6 es una citocina involucrada en la regulación de la respuesta inmune, la reacción en fase aguda, la hematopoyesis y además en su rol de citocina antiinflamatoria tiene la capacidad de suprimir la síntesis de IL-1 y TNF- α (**Tilg *et al.*, 1994**).

Una vez que se evaluó la presencia de citocinas involucradas en los procesos de la inhibición de la proliferación, el siguiente paso fue evaluar si los extractos eran capaces de inducir el incremento en la concentración de citocinas como GM-CSF, G-CSF y M-CSF, citocinas involucradas en la granulopoyesis y monocitopoyesis, los cuales son factores estimuladores clave de cada linaje (**Domínguez, 2012**). Los niveles de estos factores en el sobrenadante de la línea celular WEHI-3 no fueron detectados, estos resultados sugieren ausencia de diferenciación con el tratamiento de los extractos de *Sechium*, incluso la literatura reporta que ausencia de diferenciación en WEHI-3 con diferentes tratamientos, ya que al estimular estas células con G-CSF, no se induce diferenciación granulocítica; así como al adicionar GM-CSF, tampoco se induce diferenciación monocítica (**Li *et al.*, 1993**).

El GM-CSF es una citocina involucrada en la proliferación y diferenciación de los precursores de células mieloides, en la estimulación funcional de los granulocitos y fagocitos

mononucleares maduros, y en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas (Vilanova *et al.*, 2003). Se encontró que en cultivo de CMN-MO el tratamiento con los extractos induce el incremento en la concentración de GM-CSF, niveles basales de esta citocina en cultivos control, bajo las mismas características de manejo, ya habían sido reportados (Domínguez, 2012), los resultados en el tratamiento con los extractos *in vitro* sugiere la activación de GM-CSF en células normales, sin embargo al ser evaluadas en suero de ratones sanos, no se detectaron niveles de esta citocina, cabe resaltar que el GM-CSF normalmente no se encuentra en circulación a niveles detectables, por lo tanto, el GM-CSF se comporta de acuerdo a un modelo parácrino donde este factor se produce y actúa localmente (Gasson, 1991), por lo que sería importante en estudios posteriores comprobar su presencia en cavidad peritoneal, lugar de administración de los extractos.

Al evaluar otro potente regulador de la proliferación, diferenciación y activación de las células hematopoyéticas como es el G-CSF (Tsuchiya *et al.*, 1986), se encontró que no hay niveles detectables en cultivos de CMN-MO en control y en cultivos tratados con los extractos de *Sechium* sin embargo, en el cultivo tratado con Ara-C se encontraron niveles de 15.33 pg/mL de G-CSF, no obstante al evaluar el efecto *in vivo*, los extractos muestran un incremento significativo con respecto al control e incluso por encima del los ratones tratados con Ara-C siendo *S. compositum* el extracto que presenta mayor presencia de G-CSF, hasta 5 veces más comparado con el control. G-CSF se produce de forma natural en el cuerpo, es producido por monocitos, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y células del estroma, sus niveles tienden a incrementarse rápidamente después de la exposición a ciertos estímulos y sus aplicaciones terapéuticas se deben principalmente a que mejora la función de neutrófilos maduros y acelera la recuperación del conteo de neutrófilos después de la administración de terapias con radiación o agentes quimioterapéuticos así como en el trasplante de médula ósea, se utiliza como coadyuvante en procesos infecciosos, y como movilizador de células progenitoras a sangre periférica (Cortés, 2006; Hosing, 2012).

La presencia de G-CSF en el suero de los ratones tratados con el extracto de *Sechium*, podría relacionarse con el aumento de células en división de la médula ósea, parámetro

considerado como evidencia de activación medular de la hematopoyesis (**Donahue et al., 1986**).

M-CSF, es un factor de crecimiento que induce proliferación y diferenciación del linaje celular monocito-macrófago. Entre sus múltiples funciones se incluyen actividad fagocítica y potenciador de funciones efectoras de las células que participan en la eliminación de agentes infecciosos (virus, bacterias y hongos) y de células tumorales, por lo que M-CSF ha sido utilizado clínicamente para contrarrestar infecciones (**Navarrete et al., 1998**). Los niveles de esta citocina solo fueron detectados en el suero de los ratones con y sin tratamiento, mostrando una diferencia significativa en el tratamiento con los extractos, siendo *S. chinatnlense* el extracto que indujo la presencia de niveles más altos de M-CSF. La literatura reporta que junto con G-CSF son los factores que activan la maduración de granulocitos y monocitos (**Rambaldi et al., 1988**), además M-CSF regula la liberación de citocinas inflamatorias y otros moduladores de los macrófagos (**Pixley y Stanley, 2004**).

En el presente trabajo, se muestra que los extractos de *Sechium* si presentan selectividad entre células normales y leucémicas *in vitro*, sugiriendo que el efecto de inhibición de la proliferación y muerte celular es mediado por la vía citocinas, siendo TNF- α y MCP-1 los probables responsables, además, estos resultados aportan nuevas evidencias donde se indica, que la actividad de los extractos abarcan a células hematopoyéticas progenitoras, y coloca los extractos de *Sechium* como compuestos con propiedades reguladoras de procesos fundamentales en la hematopoyesis.

CONCLUSIONES

- Los extractos de *Sechium spp.* inhiben de forma dependiente de la concentración la proliferación de la línea celular leucémica WEHI-3.
- Los extractos de *Sechium* afectan negativamente la proliferación de las células mononucleadas de médula ósea, con casi el doble de concentración empleada para inhibir a las células tumorales, indicando una posible selectividad para dañar a las células tumorales.
- El extracto de las especies silvestres de *S. compositum* y *S. chinantlense* son más efectivos que el extracto de *S. edule* grupo varietal *nigrum spinosum* en la inhibición de la proliferación en la línea celular leucémica WEHI-3.
- TNF- α y MCP-1, son señalados como los posibles responsables del efecto de inhibición de la proliferación y muerte de las células leucémicas *in vitro* causada por los extractos de *Sechium*.
- La administración *in vivo* de los extractos, no altera de manera importante la concentración de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e INF- γ .
- La administración de los extractos estimula la producción de GM-CSF *in vitro*, en cultivos de células mononucleadas de médula ósea de ratón normal.
- *In vivo*, los extractos aumentan los niveles de G-CSF y M-CSF, lo cual podría indicar una actividad inmunoestimulante.

REFERENCIAS

- Abbas A, Lichtman A. (2003). Inmunología celular y molecular. 5ta edición. Editorial Saunders. Madrid, España.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (1997). Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, editor(s). Cellular and Molecular Immunology (Saunders Text and Review Series). New York: Elsevier.
- Abdelnour A, Ramirez C, Engelmann F. (2002). Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. SW.) a partir de brotes vegetativos. Agronomía Mesoamericana. 2: 147-151.
- ABTA (American Brain Tumor Association). (2012). Quimioterapia. USA, Chicago. Página 7.
- Acquntella G. (1995). Manual de quimioterapia. 3ra edición. Caracas, Venezuela.
- Aguiñiga SI. (2013). Potencial antileucémico *in vitro* de extractos crudos de cuatro genotipos de *Sechium spp.* (Cucurbitaceae). Tesis de Maestría. Montecillo, Texcoco. Edo. De México. Colegio de Postgraduados.
- Aguirre de Ávalos M, Quintana R, Brandan N. (2002). Citoquinas. Catedra de bioquímica. Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina.
- Akashi K, Reya T, Dalma-Weishausz D, Weissman IL. (2000b). Lymphoid precursors. Current Opinion in Immunology. 12: 144-150.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. (2000a). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature. 404: 193-197.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994). Molecular biology of the cell. Tird Edition, Garland Publishing, Inc. New York, NY.
- Amsen D, de Visser KE & Town T. (2009). Approaches to Determine Expression of Inflammatory Cytokines. Methods in molecular biology. 511: 107-142.
- Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Suda T. (2009). Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. ANNALS of the New York Academy of Sciences. 1176: 36-46.

- Avalos BR, Gasson JC, Hedrat C. (1990). Human granulocyte colony stimulating factor: Biologic activities and receptor characterization cells and small cells lung cancer cell lines. *Blood*. 75: 851-857.
- Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. (2004). Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends in Immunology*. 25: 645-649.
- Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. (2007). Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 26: 6724-6737.
- Banks RE, Forbes MA, Storr M, Higginson J, Thompson D, Raynes J. (1995). The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clinical & Experimental Immunology*. 102: 217-223.
- Barna BP, Pettay J, Barnett GH, Zhou P, Iwasaki K, Estes ML. (1994). Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *Journal of Neuroimmunology*. 50: 101-107.
- Barreda D, Hanington P, Belosevic M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental & Comparative Immunology*. 28: 509-554.
- Barry SC, Korpelainen E, Sun Q, Stomski FC, Moretti PA, Wakao H. (1997). Roles of the N and C terminal domains of the interleukin-3 receptor alpha chain in receptor function. *Blood*. 89: 842-852.
- Basu S, Dunn A, Wars A. (2002). G-CSF: function and modes of action. *International Journal Molecular Medicine*. 10: 3-10.
- Bataille R, Klein B. (1992). C-reactive protein levels as a direct indicator of interleukin-6 levels in humans in vivo, *Arthritis & Rheumatology*. 35: 982-984.
- Beall CJ, Mahajan S, Kuhn DE. (1996). Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity. *Biochemical Journal*. 313: 633-640.
- Bedoui S, Velkoska E, Bozinovski S, Jones J, Anderson G, Morris M. (2005). Unaltered TNF- α production by macrophages and monocytes in diet-induced obesity in the rat. *Journal of Inflammation*. 2: 2.
- Begley C, Lopez N, Nicola D, Warren M, Vadas C, Sanderson J, Metcalf D. (1986). Purified colony stimulating factor enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony stimulating factors. *Blood*. 68: 162-166.

- Bellantuono I. (2004). Hematopoietic stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36: 607-620.
- Benito S, López D, Saiz MP. (2002). A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *British Journal of Pharmacology*. 135: 910-916.
- Beutler B, Cerami A. (1989). The biology of cachectin/TNF. A primary mediator of the host response. *Annual Review of Immunology*. 7: 625-655.
- Beyert R, Fiers W. (1998). Tumor necrosis factor and lymphotoxin. (Edit.) Mire-Sluis A. and Thorpe R. *Cytokines*. Ed. Academic Press Inc. San Diego. 335pp.
- Bharat B, Jordan U. (1992). *Human cytokines*. Ed. Blackwell Scientific Publications, London. 405 pp.
- Billiau A, Matthys P. (2009). Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 20: 97-113.
- Blackx B, Broeders L, Bot F, Lowenberg B. (1991). Positive and negative effects of tumor necrosis factor on colony growth from highly purified bone marrow progenitors. *Leukemia*. 5: 66-70.
- Blanchard K, Michelini-Norris B, Pearson C, McMillen S, Cjeu J. (1991). Production of Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) by monocytes and large granular lymphocytes stimulated with *Mycobacterium avium*-M- intracellular: activation of bactericidal by GM-CSF. *Infection and Immunity*. 59: 2396-2402.
- Boik J. 2001. *Natural Compounds in Cancer Therapy*. Oregon Medical Press, Minesota, USA. Pág 25.
- Boing L, Papa MZ, Polak-Charcon S, Degani H. (1998). TNF-induced modulations of phospholipid metabolism in human breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1392: 217-232.
- Bonjardim CA. (2005). Interferon (INFs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses-and viruses counteract INF action. *Microbes and Infection*. 7: 569-578.
- Borish LC, Steinke JW. (2003). Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 111: 460-475.
- Bost K, Bento J, Ellington J Marriot I, Hudson M. (2000). Induction of colony stimulating factor expression following *Staphylococcus* or *Salmonella* interaction with mouse or human osteoblasts. *Infection and Immunity*. 68: 5075-5083.

- Brown Z, Strieter RM, Neild GH, Thompson RC, Kunkel SL, Westwick J. (1992). L-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney International*. 42: 95–101.
- Broxmeyer H, Williams E, Lu L, Cooper S, Anderson L, Hoffman R, Rubin Y. (1986). The suppressive influences of human tumoral necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cell from donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon-g. *Journal Immunology*. 136: 4487-4495.
- Broxmeyer HE, Youn BS, Kim C, Hangoc G, Cooper S, Mantel C. (2001). Chemokine regulation of hematopoiesis and the involvement of pertussis toxin-sensitive G alpha I proteins. *ANNALS of the New York Academy of Sciences*. 938: 117-127.
- Bueno R, Moura S, Fonseca O. (1970). Preliminary studies on the pharmacology of *Sechium edule* leaves extracts. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 40: 285-289.
- Burguer RA, Torres AR, Warren RP, Caldwell VD, Hughes BG. (1997). Echinacea-induced cytokine production by human macrophages. *International Journal Immunopharmacology*. 19: 371-379.
- Cadena JJ. (2001). Colectas de herbario No. 201 a 218 403 a 406 Herbario Hortorio Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Cadena J, Arévalo L, Avedaño C, Soto M, Ruiz E, Santiago E, nAosta M, Cisneros V, Aguirre J, Ochoa D. (2007). Production genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh produce*. 1: 41-53.
- Cadena J, Arevalo L. (2011). Las variedades del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) y su comercio mundial. México. Editorial Colegio de Postgraduados. 15-58.
- Cadena J, Soto M, Ruiz L, Santiago E, Campos G, Barriga V, Torres A. (2005). Efecto de extractos etéreos de cinco ecotipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) en diferentes líneas tumorales. In: *Memorias del IV Seminario Internacional Efraín Hernández Xocolotzin in memoriam*. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca.
- Cadena JD. (2013). Inducción de la fragmentación del DNA en líneas celulares leucémicas y normales de ratón por extractos de *Sechium* spp. Tesis de licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Cadena-Iñiguez J, Avedaño CH, Soto M, Ruiz LM, Aguirre JF, Arévalo L. (2008). Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw in the state of Veracruz, México. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55: 835-847.

- Cadena-Iñiguez J. (2005) Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, México.
- Cambar P, Portillo P, Tabara E, Pineda L, Tovar O, Casco J, Alvarado C, Días G, Casco B, Cantillo L. (1980). Estudio preliminar sobre las acciones farmacológicas de *Sechium edule*. Revista Médica de Honduras. 48: 97-99.
- Cannistra SA, Groshek P, Garlick R, Miller J, Griffin JD. (1990). Regulation of surface expression of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor in normal human myeloid cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 87: 93-97.
- Carr M, Roth S, Luthet E, Rosa S, Spinger T. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as T-lymphocyte chemoattractant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91: 3652-3656.
- Carson RT, Vignali DA. (1999). Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. Journal of Immunological Methods. 227: 41-52.
- Caux C, Saeland S, Favre C, Dubert V, Mannoni P, Banchereau J. (1990). Tumor necrosis factor-alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitors cells. Blood. 75: 2292-2298.
- Cerutti A, Zan H, Schaffer A, Bergsagel L, Harindranath N, Max EE, Casali P. (1998). CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. Journal Immunology. 160: 2145-2157.
- Chapoval A, Kamdar S, Kremlev S, Evans R. (1998). CSF-1 (M-CSF) differentially sensitizes mononuclear phagocyte subpopulations to endotoxin in vivo: a potential pathway that regulates the severity of gram-negative infections. Journal of Leukocyte Biology. 63: 245-252.
- Chávez JM. (2006). Determinación de la inducción de aberraciones cromosómicas por el factor estimulante de colonias de Granulocitos (G-CSF) sobre linfocitos T y células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de donadores. Tesis para obtener el grado de Maestra en ciencias biológicas. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias.
- Cheng, L M y Wang, Q R. (2002). Hematopoietic inhibitors elaborated by bone marrow endothelial cells. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 10:485-91.

- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cell compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 3120-3125.
- Choy E. (2004). Clinical experience with inhibition of interleukin-6. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 30: 405-415.
- Cochran BH, Reffel AC, Stiles CD. (1983). Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell*. 33: 939-947.
- Cockerill PN, Bert AG, Roberts D, Vadas MA. (1999). The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene is autonomously regulated in vivo by an inducible tissue-specific enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 15097-15102.
- Conti I, Rollins BJ. (2004). CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 14: 149–154.
- Cook OF. (1901). The chayote: A tropical vegetable. Bulletin No. 28. Division of Botany, U.S. Department of Agriculture, USA.
- Cordell GA, Kinghorn AD, Pezzuto JM. (1993). Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. In: Colegate, S.M.; Molyneux, R.J. (ed). *Bioactive Natural Products. Detection, isolation and structural determination*. CRC Press. London. 31: 196-219.
- Cornejo, H. Oblitas, F. Cruzado, S. Quispe, W. (2010). Evaluación de una prueba de ELISA con antígeno metabólico de *Fasciola hepática* para el diagnóstico de fasciolosis humana en Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 27:569-574.
- Cortés AD. (2006). Revisión de la literatura: Evaluación del uso de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF) en pacientes con neoplasias sólidas en pediatría. Tesis de especialista en pediatría. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina.
- Cousar J. (1999). The hematopoietic-lymphoid neoplasms: Principles of diagnosis. En: Lee G. Foerster J. Lukens J. Paraskevas F. Greer J. Rodgers G. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10^a ed. Lippincott Williams & Wilkins USA. Pp 1472-1475.
- Cova-Pérez A. (2006). Alteraciones en la expresión del TNF-alfa, en un modelo tipo monocito, inducidas por líneas de carcinoma pulmonar. Tesis de licenciatura. México, D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Craig M, Loberg R. (2006). CCL 2 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) in cancer bone metastasis. *Cancer Metastasis Review*. 25: 611-619.
- Cremer I, Vieillard V, De Maeyer E. (2000). Retrovirally mediated INF- β transduction of macrophages induces resistance to HIV, correlated with up-regulation of RANTES production and down-regulation of C-C chemokine receptor-5 expression. *Journal of Immunology*. 164: 1582-1587.
- Croft M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature Reviews Immunology*. 9: 271-285.
- Cross, H.B. (2003). Evolution, systematics and domestication in *Sechium* and related genera (Sicyeae, Cucurbitaceae). Tesis doctoral. Columbia University. U.S.A.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87: 5134-5138.
- Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264: 1415-1421.
- Darzynkiewicz S, Bruno S, Del Bino G, Gorcyca W, Hotz M, Lassota P, Traganos F. (1992). Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. The Cancer Research Institute, New York Medical College, Valhalla 10595.
- David, G M. (2005). Splenic arterial interventions: anatomy indications technical, considerations and potential considerations. *Radiographics*. 25:S191-S211.
- Davis W, Brown W, Wood P. (1996). Overview of the first international Symposium on Cytokines and Type I Type II Paradigm concerned in Cairns, Australia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 63: 121-123.
- Degliatoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis B, Perussia G, Trinchieri G. (1985). Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony inhibiting activity and NK cytotoxic factor: relationship with tumor necrosis factor and synergy with immune interferon. *The Journal of Experimental Medicine*. 162: 1512-1530.
- DeKoter R, Walsh J and Singh. (1998). PU.1 regulates both cytokine dependent proliferation and differentiation of granulocyte macrophage progenitors. *EMBO Journal*. 17: 4456-4468.

- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 29: 313-326.
- Díaz BP. (2007). Relación de la trombopoyetina, IL-6 y la expresión del receptor C-MPL en la trombocitosis inducida por la inhalación crónica de vanadio. Modelo experimental en ratón. Tesis de Maestría. México, D.F. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Digel W, Stefanic M, Schoniger W, Buck C, Raghavachar A, Frichhofen N, Heimpel H, Porzolt F. (1989). Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 73: 1242-1246.
- Dilloo D, Brown M, Roskrow M, Zhong W, Holladay M, Holden W, Brenner M. (1997) CD40 Ligand induces an antileukemia immune response *in vivo*. *Blood*. 90: 1927-1933.
- Dinarello CA, Moldawer LL. (1999). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Amgen, Thousand Oaks. CA, USA.
- Diré G, Lima E, Gomes M, Bernardo FM. (2003). The effect of a chayotte (*Sechium edule*) extracts (decoct and macerated) on the labeling of blood elements with technetium-99m and on the biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate in mice: an *in vitro* and *in vivo* analysis. *Pakistan Journal* 2: 221-227.
- Domínguez MV. (2012). Evaluación de la actividad del caseinato de sodio (CasNA) sobre la inducción de la mielopoyesis y linfopoyesis. Tesis de doctorado. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Seghal PA, Nathan DG, Clark SC. (1986). Stimulation of hematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature*. 321: 872-875.
- Dorantes AE. (2009). Caracterización de células troncales y progenitoras hematopoyéticas en leucemia mieloide aguda infantil. Tesis de Posgrado en Ciencias Médicas. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Douglass T, Driggers L, Zhang J, Hoa N, Delgado C, Williams C, Dan Q, Sanchez R, Jeffes E, Wepsic H, Myers M, Kothe K, Adams M, (2008). Macrophage colony stimulating factor: not just for macrophages anymore!. A gateway into complex biologies. *International Immunopharmacology*. 8: 1354-1376.
- Erta M, Quintana A, Hidalgo J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International Journal of Biological Sciences*. 8: 1254-1266.

- Esquivel CA. (2007). Análisis del efecto de INF- γ sobre la activación de NF- $\kappa\beta$ en células endoteliales humanas tratadas con TNF- α . Tesis de Maestro en Ciencias Odontológicas. Tesis de licenciatura. Posgrado de la Facultad de Odontología. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Farrar MA, Schreiber RD. (1993). The molecular biology of interferon gamma and its receptor. *Annual Review of Immunology*. 11: 571-611.
- Ferrara F, Schiffer CA. (2013). Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*. 381:484-495.
- Fey MF. (2007). Normal and malignant hematopoiesis. *Annals of Oncology*. Supplement 1. 18: i9-i13.
- Fialkow P, Singer J, Raskind W, Adamson J, Jacobson R, Bernstein I, Dow L, Najfeld V, Veith R. (1987). Clonal development, stem-cell differentiation, and clinical remission in acute nonlymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 317: 468-473.
- Figueroa VA. (2010). Estudio comparativo de niveles sericos de marcadores inflamatorios (IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) entre pacientes con glioma de alto grado sin tratamiento específico y en sujetos sanos. Tesis de Posgrado en Neurocirugía. México, D.F. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fink MP. (2001). The prevention and treatment of sepsis: is interleukin-6 a drug target or a drug? *Critical Care Medicine*. 34: 919-921.
- Firmbach-Kraft I, Byers M, Shows T, Dalla-Favera R, Krolewski JJ. (1990). Tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene*. 5: 1329-1336.
- Florensa L, Col MT, Woessner S. (2006). Hematopoyesis, morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos. In: Sans-Sabrafen J, Raebel CB, Corrons JLV, editors(s). *Hematología clínica*. Madrid, España. Elsevier.
- Flores EM. (1989). El chayote, *Sechium edule* (jacq.) Sw. (cucurbitaceae). *Revista de Biología Tropical*. 37: 1-54.
- Freshney R. (1994) *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 3ra edición. Wiley-Liss, Inc. USA.
- Gabilove JL, Jakubowski A. (1989). Granulocyte colony-stimulating factor: preclinical and clinical studies. *Hematology / Oncology clinics of North America*. 3: 427-440.

- Ganser A, Karthaus M. (1996). Clinical use of hematopoietic growth factors. *Current Opinion in Oncology*. 8: 265-269.
- Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Muller-Newen G, Grotzinger J, Rose-John S, Scheller J. (2012). Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Review*. 23: 85-97.
- Gartsbein M, Alt A, Hashimoto K, Nakajima K, Kuroki T, Tennenbaum T. (2006). The role of protein kinase C delta activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin induced keratinocyte proliferation. *Journal of Cell Science*. 119: 470-481.
- Gasson JC. (1991). Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 77: 1131-1145.
- Giles FJ, Keating A, Goldstone A, Avivi I, William C, Kantarjian HM. (2002). Acute Myeloid Leukemia. *Hematology*. 1: 73-110.
- Gillies R, Didier N, Dentosn M. (1986). Determinations of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*. 159: 109-113.
- Giora M, Alexander A, Chuslip C, Humberto C, Didney W, Jordan U. (1992). Regional biologic therapy. Hepatic arterial infusion of recombinant human tumor necrosis factor in patients with liver metastases. *Cancer*. 69: 557-561.
- Goldman J. (1995). Peripheral Blood Stem Cells for Allografting. *Blood*. 85: 1413-1415.
- Gómez GG. (2013). Valoración de parámetros bioquímicos y hematológicos en ratones sanos tratados con extractos de *Sechium* spp. Tesis de licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- González MJ. (2008). Correlación de la determinación plasmática de IL-6 en la detección de estrangulación en pacientes con oclusión intestinal. Tesis de especialista en cirugía general. México, D.F. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gordaliza M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*. 9: 767–776.
- Gray PW, Goeddel DV. (1982). Structure of the human immune interferon gene. *Nature*. 298: 859-863.

- Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaar JM, Xiong Y, Tse W. (2009). Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Journal of Hematology & Oncology*. 2:23.
- Guidez F, Li A, Horvai A, Welch J, Glass C. (1998). Differential utilization of Ras signaling pathways by macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF receptors during macrophage differentiation. *Molecular Biology of the Cell*. 18: 3851-3861.
- Guimaraes-Iglesias V, Guiñon-Gil E, Gabernet G, Belinchón-García M, Osuna-Sánchez M, Casanelles E, Comella XC, Yuste V. (2012). Apoptotic DNA Degradation into Oligonucleosomal Fragments, but Not Apoptotic Nuclear Morphology, Relies on a Cytosolic Pool of DFF40/CAD Endonuclease. *The Journal of Biological Chemistry*. 287: 7766-7779.
- Guo Y, Feng Xu, TianJian L, Zhenfeng D, Zhan Z. (2012). Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 38: 904-910.
- Guppy LJ, Gordon EA, Nelson M. (2000). The antiproliferative effects of the jamaican Cho-Cho (*Sechium edule*). *West Indian Medicine Journal*. 49: 27-31.
- Gutiérrez M. (2006). Síndromes hematológicos. Su relación con las enfermedades que lo producen. Edit. Prado. Pp 473-491.
- Hamblin A. (1993). Cytokines and cytokine receptors. Ed. IRL Press Oxford University Press, London. 90 pp.
- Hao QL, Thiemann FT, Petersen D, Smogorzawska EM, Crooks GM.. (1996). Extended long term culture reveals a highly quiescent and primitive human haematopoietic progenitor population. *Blood*. 88: 3306-3313.
- Hasegawa Y, Bai A, Kojima H, Komeno T, Ninojima H, Nagasawa T. (2000). Priming effects of macrophage colony stimulating factor on monocytic leukemia cells in combination with chemotherapy: induction of programmed cell death in vivo. *Leukemia & Lymphoma*. 36: 589-593.
- Haynes BF, Fauci AS. (2006). Harrison's Rheumatology. In: Fauci AS, Langford CA, editor(s). *Harrison's Rheumatology*. New York: McGraw-Hill Profesional.
- Heinrich PC, Behrman I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochemical Journal*. 374:1-20.
- Hernández XE. (1985). *Biología Agrícola*. CECSA. México. 62 p.

- Hewit R, Morse G, Lawrence W, Maliszewski M, Santora J, Bartos L, Bonnem E, Poiesz B. (1993). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and zidovudine in patients with AIDS and severe AIDS related complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37: 512-522.
- Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K. (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutrition Science Vitaminology*. 47: 357-362.
- Ho CY, Lau BS, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chan HL, Chow SS. (2004). Differential effect of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on cytokine production by murine lymphocytes in vitro. *International Journal Immunopharmacology*. 4: 1549-1557.
- Horny HP, Ruck M, Kaiserling E. (1990). Immunohistology of human spleen after bone marrow transplantation for leukemia with special reference to early post-transplantation period. *Pathology research and practice*. 186: 775-783.
- Hosing C. (2012). Hematopoietic stem cell mobilization with G-CSF. *Methods in Molecular Biology*.
- Hughes N, Wickramasinghe S, Hatton C. (1991). *Lecture Notes on Haematology*. Ed. Blackwell Scientific Publications, London. 225 pp.
- Humphreys DT, Wilson MR. (1999). Modes of L929 cell death induced by TNF-alpha and other cytotoxic agents. *Cytokine*. 11: 773-782.
- Ibelgaufts H. (1995). *Dictionary of cytokines*. Ed. 5a. New York, NY. Editorial VCH. 777 pp.
- Ihle JN, Nosaka T, Thierfelder W, Quelle FW, Shimoda K. (1997). Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells*. 15: 105-112
- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. (1995). Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annual Review of Immunology*. 13: 369-398.
- Jacobsen S, Ruscetti F, Ortiz M, Gooya J, Keller J. (1994). The growth response of Lin-Thy-1+ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy og multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. *Experimental Hematology*. 22: 985.
- Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak M. (2001). Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem cells*. 19: 99-107.

- Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR and Reddy EP. (2010). JAK/STAT Pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders. *Genes Cancer*. 1: 979-993.
- Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG. (2003). Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Letters*. 189:11-16.
- Joshi SS, Lynch JC, Pavletic SZ, Tarantolo SR, Pirruccello SJ, Kessinger A. (2001). Decreased immune functions of blood cells following mobilization with granulocyte colony-stimulating factor: association with donor characteristics. *Blood*. 98: 1963-1970.
- Kantarjian H, Dixon D, Kreating D, Kreating M, Talpaz M, Walters R, McCredie K, Freireich E. (1988). Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 61: 1441-1446.
- Kaplinsky C, Trakhtenbrot L, Hardan I, Reichart M, Daniely M, Toren A, Amariglio N, Rechavi G, Izraeli S. (2003). Tetraploid myeloid cells in donors of peripheral blood stem cells treated with rhG-CSF. *Bone Marrow Transplant*. 32: 31-34.
- Kawasaki H, Onuki R, Suyama E, Taira K. (2002). Identification of genes that function in the TNF-alpha-mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries. *Nature Biotechnology*. 20: 376-380.
- Kishimoto T. (2005). Interleukin-6: From basic science to medicine. 40 years in Immunology. *Annual Reviews Immunology*. 23: 1-21.
- Klein G. (1995). The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*. 51: 914-926.
- Kolkowski EC. (2004). Linfocitos intraperitoneales en la enfermedad celiac. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Barcelona, España. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Kondo M, Scherer DC, King AG, Manz MG, Weissman IL. (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*. 11: 520-526.
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 91: 661-672.
- Kueng W, Silber E, Appenberger U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*. 182: 16-19.
- Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. (2006). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annual Review of Immunology*. 24: 705-738.

- Landis S, Murray T, Bolden S, Wingo P. (1999). Cancer statistics. CA- A Cancer Journal for Clinicians. 49: 8-31.
- Lange W, Brugger F, Rosenthal L, Kanz A, Lindemann A. (1991). The role of cytokines in oncology. The International Journal of Cell Cloning. 9: 252-273.
- Lavani A, Pareek M. (2010). Interferon gamma release assays: principle and practice. Clinical Microbiology and Infection Diseases. 28: 245-252.
- Ledesma E, Córdova Y, Weiss B, García A, Santiago E. (2005). El caseinato de sodio (CasNa) induce la producción de TNF- α , TGF- β y MIP1- α , en la línea celular 32D. Revista de Hematología. 6: S12-S13.
- Lee JC, Hapel AJ, Ihle JN. (1982). Constitutive production of a unique lymphokine (IL 3) by the WEHI-3 cell line. Journal Immunology. 128: 2393-2398.
- Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. (1998). Clinical applications of TNF-alpha in cancer. Current Opinion Immunology. 10: 573-80.
- Li J, Koay D, Xiao H, Sartorelli A. (1993). Regulation of the differentiation of WEHI-3BD+ leukemia cells by Granulocyte colony-stimulating factor receptor. The Journal of Cell Biology. 120: 1481-1489.
- Li J, Sartorelli A. (1992). Synergistic induction of the differentiation of WEHI3BD+ myelomonocytic leukemia cells by retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. Leukemia Research. 16: 571-576.
- Lickliter JD, Wood NJ, McHugh G, Tan J, Wood F, Cox J y Wickham NW. (2003). HA14-1 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death. Leukemia. 17: 2074-2080.
- Lieschke GJ, and Burgees AW. (1992). Drug therapy: Granulocyte Colony Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (second of two parts). New England Journal of Medicine. 327: 99-106.
- Lira R, Castrejon S, Zamudio Z, Rojas Z. (1999). Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. Acta Botánica Mexicana. 49:47-61.
- Lira-Saade R. (1996). Chayote. *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8 Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

- Liu H, Grundström T. (2002). Calcium regulation of GM-CSF by calmodulin-dependent kinase II phosphorylation of Ets. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 4497-4507.
- Lozoya X. (1980). Mexican medicinal plants used for treatment of cardiovascular diseases. *The American Journal of Chinese –Medicine*. 8: 86-95.
- Lu L, Heinrich M, Wang L, Dai M, Zigler A, Chai L, Broxmeyer H. (1999). Retroviral-mediated gene transduction of c-kit into single hematopoietic progenitor cells from cord blood enhances erythroid colony formation and decreases sensitivity to inhibition by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1. *Blood*. 7: 2319-2332.
- Luo Y, Laning J, Hayashi M, Hancock PR, Rollins B, Dorft ME. (1994). Serologic analysis of the mouse beta chemokine JE/monocyte chemoattractant protein-1. *The Journal of Immunology*. 153: 3708-3716.
- Luster AD, Rothenberg ME. (1997). Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 65: 620-633.
- MacMicking JD. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature Reviews Immunology*. 12: 367-382.
- Mans DR, da Rocha AB, Schwartzmann G. (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*. 5: 185–198.
- Mansell A, Jenkins BJ. (2013). Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: A potent combination in inflammation and cancer. *Cytokine Growth Factor Review*. 24: 249-256.
- Martinez-Jaramillo G, Flores-Figueroa E, Gómez-Morales E, Sánchez-Valle E, Mayani H. (2001). Tumor necrosis factor-alpha levels in long-term marrow cultures from patients with aplastic anemia: modulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *American Journal of Hematology*. 3: 144-148.
- Martins TB, Pasi BM, Pickering JW, Jaskowski TD, Litwin CH, Hill HR. (2002). Determination of Cytokine Responses Using a Multiplexed Fluorescent Microsphere Immunoassay. *American Journal Clinical Pathology*. 118: 346-353.
- Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzmán P. (2003). Biology of human hematopoietic stem and progenitors cells present in circulation. *Archives of Medical Research*. 34: 476-488.

- Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ. Flores-Guzmán P y Chávez-González A. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*. 2: 95-107.
- Metcalf D, Begley CG, Johnson NA, Vadas MA, Lopez A. (1986). Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 67: 37-45.
- Metcalf D. (1980). Clonal extinction of myelomonocytic leukemic cells by serum from mice injected with endotoxin. *International Journal of Cancer*. 25: 225-233.
- Metcalf D. (1999) Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: Are our dogmas correct?. *Annals of The New York Academy of Sciences*. 872: 289-303.
- Metcalf D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood*. 111: 485-491.
- Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Shina M. (2012). IL-1/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science London*. 122: 143-159.
- Milligan ED, Twining C, Chacur M, Bledenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *The Journal of Neuroscience*. 23: 1026-1040.
- Mire-Sluis AR, Thorpe R. (1998). *Cytokines*. Ed. Academic Press. USA. Pp. 335-351.
- Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Annual Review of Immunology*. 10: 295-331.
- Monti P, Leone BE, Marchesi F, Balzano G, Zerbi A, Scaltrini F, Pasquali C, Calori G, Pessi F, Sperti C, DiCarlo V, Allavena P, Piemonti L. (2003). The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimetastatic activity. *Cancer Research*. 63: 7451-7461.
- Morris S. (1991). Reassignment of the human CSF1 gene to chromosome 1p13-p21. *Blood*. 78: 2013-2020.
- Morrisey P, Bressler L, Park S, Albert A, Gillis S. (1987). Granulocyte macrophage colony stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen presenting cells. *Journal Immunology*; 139: 113-1119.
- Munker R, Hiller E, Glass J, Paquette R. (2007). *Modern hematology. Biology and clinical management*. 2da edición. Ed. Human Press, New Jersey. 498 pp.
- Munker R, Hiller E, Paquette R. (1998). *Modern hematology. Biology and clinical management*. Ed. Human Press, New Jersey. 369 pp

- Murphy M, Perussia B, Trincheri G. (1988). Effects of recombinant tumor necrosis factor, lymphotoxin, and immune interferon on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic precursor cells. *Experimental Hematology*. 16: 131.
- Nagler A, Shur I, Barak V, Fabian I. (1996). Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor depend Monocyte-mediated Cytotoxicity Post.Autologous Bone Marrow Transplantation. *Leukemia Research*. 20: 637-643.
- Nathuan C, Sporn M. (1991). Cytokines in Context. *The Journal of Cell Biology*. 113: 981-984.
- Navarrete MV, Rangel CR, Corona OT, Weiss SB, Mendoza RJ. (1998). Efecto del M-CSF sobre la proliferación de las líneas celulares CALO e INBL provenientes de carcinoma cérvico-uterino. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 1: 69-73.
- Negrier M, Pourreau C, Palemr P. (1992). Phase I trial of recombinant interleukin-2 followed by tumor necrosis factor in patients with metastatic cancer. *Journal Immunotherapy*. 11: 93-102.
- Nicola NA. (1987). Why do hemopoietic growth factors receptors interact with each other? *Immunology today*. 8: 134-140.
- O'Malley K, Moldawer LL. (2006). Interleukin-6: Still crazy after all these years. *Critical Care Medicine*. 34: 2690-2691.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. (2002). Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. 109: S121- 131.
- Ordoñez A, Gomez J, Cudmani N, Vattuone M, Isla I. (2003). Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Microbiology of ecology Health*. 15: 33-39.
- Ordoñez A, Gomez J, Vattuone M, Isla I. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*. 97:452-458.
- Orlic D, Anderson A, Biesecker L, Sorrentino B, Bodine D. (1995). Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 4601-4605.
- Ortega-Paczka R, Martínez-Alfaro MA, Rincón-Enríquez G. (1998). Principales cultivos de México y sus regiones mundiales de mayor diversidad. XVII Congreso de

fitotecnia. Memoria de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. México. Páginas. 93,321.

- Ortmann R, Cheng T, Visconti R, Fruncht D, O'shea J. (2000). Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation. *Arthritis Research*. 2: 16-32.
- Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. (1998). The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine*. 128: 127-137.
- Park W, Lee M, Park K, Kim E, Kim B, Lee Y. (2002). Monensin-mediated growth inhibition in acute myelogenous leukemia cells via cell cycle arrest and apoptosis. *International Journal of Cancer*. 101: 235-242.
- Pelus LM, Fukuda S. (2008). Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia*. 22: 466-473.
- Pennica D, Nedwin G, Hayflick J, Seeburg P, Derynck R, Palladino M, Kohr W, Aggarwal B, Goeddel D. (1984). Human tumor necrosis factor. Pre-cursor structure, expression, and homology to lymphotoxin. *Nature*. 312: 724-729.
- Pfeffer K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Review*. 14: 185-191.
- Pierce, J, Di Marco E, Cox G, Lopmbardi D, Ruggiero M, Di Fiore P, Aaronson, S. (1990). Macrophage-colony stimulating factor (CSF-1) induces proliferation, chemotaxis, and reversible differentiation in myeloid progenitor cells transfected with the human c-fms/CSF-1 receptor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 5613-5617.
- Pixley FJ, Stanley ER. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends in Cell Biology*. 14: 628-638.
- Prieto-Echagüe V, Miller WT. (2011). Regulation of ack family nonreceptor tyrosine kinases. *Journal of Signal Transduction*. 2011: 1-9.
- Ralph P, Malcolm A, Moore S, Kenneth N. (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *The Journal of Experimental Medicine*. 143: 1528-1533.
- Ralph P, Nakoinz I. (1977). Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture. *Cancer Research*. 37: 546-550.

- Ramakrishnan A, Torok-Storb BJ. (2010). The role of bone marrow microenvironment in hematopoietic stem cell transplantation. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2: 7-12.
- Rambaldi A, Wakamiya N, Vellenga N, Horiguchi J, Warren MK, Kufe D and Griffin JD. (1988). Expression of the macrophage colony-stimulating factor c-fms genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 81: 1030-1035.
- Ramos MG. (2004). Efecto de caseínas y casomorfínas en la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mieloides 32D y WEHI-3. Tesis de doctorado. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S. (2000). IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*. 19: 2532-2547.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L, Lu Y, Cui Y, Zhang Z, Wang Z. (2001) Tartary buckwheat flavonoid activates caspase 3 and induces HL-60 cell apoptosis. *Methods Find Experimental Clinical Pharmacology*. 23: 427-432.
- Ribeiro R, Barros F, Fiuza M, Muñiz C, Chieia S, Wanderley G, Gomes G, Trolin G. (1988). Acute diuretic effects in conscious rats, produced by some medicinal plants use in the state of Sao Paulo, Brasil. *Journal of ethnopharmacology*. 24: 9-29.
- Rivera MA. (2011). Efecto del extracto de *Sechium chinantlense* Lira & F. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey y el híbrido H-387-07-GISeM sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929. Tesis de licenciatura. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Robak T, Wierzbowska A. (2009). Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clinical Therapeutics*. 31: 2349-2370.
- Robb L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*. 26: 6715-6723.
- Robinson S, Rose W. (1992) Transforming growth factor beta 1: lack of *in vivo* antitumor activity on A549 and WEHI 3BD+ tumors. *Anticancer Research*. 12: 73-79.
- Ross JA, Auger MJ. (2002). The biology of the macrophage. Burke B & Lewis C.E. eds. 2nd. Oxford University Press. Oxford. Pp 1-56.
- Ruiz M, Martínez ML. (2007). Trichinellosis: Técnica Inmunoenzimática de diagnóstico (ELISA). En mejoramiento del control de la trichinellosis. FAO América

Latina y el Caribe. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Páginas: 84-87.

- Ryan G, Dai X, Dominguez M, Tong W, Chuan F, Chisholm O, Ruseel R, Pollard J, Stanley R. (2001). Rescue of the colony stimulating factor 1 (CSF-1) nullizygous mouse ($Csf1^{op}/Csf1^{op}$) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood*. 98: 74-84.
- Rzedowsky J. (1993). Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. In: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.). *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press.
- Rzedowsky J. (1995). Aspectos de las plantas ornamentales mexicanas. *Chapingo, Serie: Horticultura*. Vol. 1 No. 3: 5-7
- Sachs L. (1996). The control of haematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 4742-4749.
- Saklani A, Kutty SK. (2008). Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*. 13: 161–171.
- Salama MA, Polo N, Contreras M, Maldonado RL. (1986). Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades anti-inflamatoria y cardiaca de *Sechium edule*. *Revista del Colegio de Ciencias Químico-farmacéuticas*. 12:79- 82.
- Salas M., Torres M. (2007). Efectos de extractos de diferentes variedades de chayote *Sechium edule* en la proliferación de diferentes líneas tumorales. Reporte de servicio social. Carrera de Biología, FES-Zaragoza, UNAM.
- Salmassi A, Mettler L, Walter J, Sybille B, Kerstin K, Schmutzler A. (2010). Circulating level of macrophage colony-stimulating factor can be predictive for human in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 93: 116-123.
- Sánchez I. (1997). Consequences of chromosomal abnormalities in tumor development. *Annual Review of Genetics*. Vol. 31:429-453.
- Santibañez A, Espino S. (2013). Factor estimulante de colonias de granulocitos en liquid foliar: ¿Factor pronóstico en fecundación in vitro? Tesis para obtener el grado en Biología de la Reproducción humana. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Nacional de Perinatología.
- Scheller J, Grotzinger J, Rose-John S. (2006). Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling. *Signal Transduction*. 6: 240-259.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. (2004). Interferon-gamma an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 75: 163-189.

- Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B (2009). How much is too much? Interleukin-6 and its signaling in atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 102: 215-222.
- Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S. (2002). Oxygen, Oxidants, and Antioxidants in Wound Healing: A Emerging Paradigm. *Annales New York Academic Science*. 957: 239-242.
- Setzer W, Setzer M. (2003). Plant-derived triterpenoid as potential antineoplastic agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 15: 540-556.
- Shouqing L, Dexian Z, Yanxin L, Qing R, Kefu W. (2000). Analysis of the ligand-binding domain of macrophage colony-stimulating receptor. *Chinese Science Bulletin*. 45: 1191-1195.
- Siciliano T, De Tomás N, Morelli I, Braca A. (2004). Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz (cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*. 52:6510-6515.
- Sidhu R, Bollon A. (1993). Tumor necrosis factor activities and cancer therapy. A perspective. *Pharmacology & Therapeutics*. 57: 79-128.
- Soddu S, Blandino G, Scardigli R, Marntinelli R, Rizzo M. (1996). Wild type p53 induces diverse effects in 32D cells expressing different oncogenes. *Molecular and Cellular Biology*. 16: 487-95.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 241: 58-62.
- Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. (1991). Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 266: 9912-9918.
- Steevens TA, Meyaard L. (2011). Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. *European Journal of Immunology*. 41: 575-587.
- Stone R, O'Donnell M, Sekeres M. (2004). Acute myeloid leukemia. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 98-117.
- Sung YY, Kim YS, Kim HK. (2012). *Illicium verum* extract inhibits TNF- α and INF- γ induced expression of chemokines and cytokines in human keratinocytes. *Journal Ethnopharmacology*. 144: 182-189.

- Sweet M, Hume D. (2003). CSF-1 as a regulator of macrophage activation and immune responses. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentails*. 51: 169-177.
- Szilvassy S, Hoffman R. (1995). Enriched hematopoietic stem cells: basic biology and clinical utility. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 1: 3-17.
- Tagoh H, Himes R, Clarke D, Leenen OP, Riggs A, Hume D, Bonifer C. (2002). Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells. *Gene & Development*. 16: 1721-1737.
- Tallman M, Gilliland D. (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 106: 1154-1163.
- Támok A, Ulrich H, Bocsi J. (2010). Phenotypes of stem cells diverse origin. *Cytometry Part A*. 77: 6-10.
- Taniguchi T. (1995). Cytokine signaling through non-receptor tyrosine kinases. *Science*. 268: 251-255.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. (2008). Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9: 231-241.
- Thomas TE, Miller CL, Eaves CJ. (1999). Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. *Methods*. 17: 202-218.
- Tiburcio FR. (2011). Efecto de extractos crudos de especies silvestres de *Sechium* spp. (*S. chinantlense* (Lira & Chiang) y *S. compositum* (J.D. Smith) C. Jeffrey) y un híbrido H-387-07-GISem, sobre la proliferación de líneas leucémicas mieloides de ratón. Tesis de licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Tilg H, Trhe E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*. 83: 113-118.
- Tracey K, Cerami A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Review of Medicine*. 45:491.
- Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Nagata S. (1986). Isolation and characterization of the cDNA for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83: 7633-7637.

- Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. (1999). The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Review*. 10: 61-86.
- Van de Gejin GJ, Gits J, Aarts LH, Heijmans-Antoniseen C, Tour IP. (2004). G-CSF receptor truncations found in SCN/AMK relieve SOCS3-controlled inhibition of STAT5 but leave suppression of STAT3 intact. *Blood*. 104: 667-674.
- Vanhaesebroeck B, Vogt PK, Rommel C. (2010). PI3K: from the bench to the clinic and back. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 347:1-19.
- Varela JA, Crispín JC. (2006). Inmunorregulación en enfermedades reumáticas. In: Alarcon Segovia D, Molina L. J, editor(s). *Tratado Hispanoamericano de Reumatología*. Bogotá: Schering-Plough S. A.
- Vega-Ávila E, Velasco-Lezama R, Jiménez-Estrada M. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica*. 31: 97-111.
- Velázquez GH, Sanchez VJ, López CJ. (2001). *Citocinas*. Mexicali, B.C. Universidad Autónoma de Baja California.
- Verfaillie CM, Catanzarro PM, Li WN. (1994). Macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin 3 and diffusible marrow stromal factors maintain human hematopoietic stem cells for at least eight weeks *in vitro*. *The Journal of Experimental Medicine*. 179: 643-649.
- Vilanova LT, Rauch MC, Zambrano A, Brito M, Werner E, Concha I. (2003). Caracterización funcional y localización del receptor GM-CSF en espermatozoides bovinos. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 35: 139-150.
- Vilcek J, Palombella V, de Stephamo D, Swenson C, Feinman R, Hirai R, Tsujimoto M. (1986). Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *The Journal of Experimental Medicine*. 163: 632-643.
- Wakelin L, Adams A, Hunter C, Waring J. (1981). Interactions of crystal violet with nucleic acids. *American Chemical Society*. 20: 2779-2787.
- Wang KY, Arima N, Higuchi S, Shimajiri S, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Saaguri Y. (2000). Switch of histamine receptor expression from H2 to H1 during differentiation of monocytes into macrophages. *FEBS Letters*. 473: 345-348.
- Warner, N L. Moore, M A. Metcalf, D. (1969). A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *Journal National Cancer Institute*. 43:963-982.

- Watada A, Herner R, Keder A, Romani R, Staby G. (1985). Terminology for description of developmental stages of horticulture crops. *Hortscience*. 19: 20-21.
- Weissman IL. (2000a). Stem cells: units of development, units of the regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100: 157-168.
- Weissman IL. (2000b). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 287: 1442-1446.
- Wen Y, Yang J, Kuo S, Hwan C, Chung J, Wu H, Huang W, Jhan J, Lin C, Chen H. (2010). Investigation of anti-leukemia molecular mechanism of ITR-284, a carboxamide analog, in leukemia cells and its effects in WEHI-3 leukemia mice. *Biochemical Pharmacology*. 79: 389-398.
- Wheelock, EF. (1965). Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Sciences, New Series*. 3681: 310-311.
- Wu T, Chow L, Lin J. (1998). Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible *Sechium edule* Swartz. Purification, characterization, molecular cloning and expression. *European Journal of Biochemistry*. 255: 400-408.
- Xal. (2001). Mapa de ubicación de colectas de *Sechium edule* (Jacq.) Sw., en el Estado de Veracruz, México. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México.
- Xiao-Hong D, Rivas C, Heaney M, Raines M, Vera J, Golde D. (1994). The α subunit of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 2537-2541.
- Xu L, Warren M, Rose W, Gong W, Wang J. (1996). Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*. 60: 365-371.
- Yamaguchi M, Nadler S, Lee J, Deeg H. (1999). Induction of negative regulators of haematopoiesis in human bone marrow cells by HLA-DR cross-linking. *Transplant Immunology*. 7: 159-168.
- Yen GC, Chen HY, Peng HH. (2001). Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem. Toxic*. 39: 1045–1053.
- Yin T, Li L. (2006). The stem cell niches in bone. *The Journal of Clinical Investigation*. 116: 1195-1201.
- Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ. (1989a) Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by

phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *The Journal of Immunology*. 142: 1956–1962.

- Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. (1989b). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen- stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Letters*. 244: 487–493.
- Zambrano I, Santiago E, Weiss B, Cáceres J. (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Revista de Investigación Clínica*. 51: 53-68.
- Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE. (1996). Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene expression contributes to the anti-adipogenic effects of tumor necrosis factor- α . *Molecular Endocrinology*. 10: 1457-1466.

APÉNDICE I

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Obtención de extractos

Se utilizaron frutos en madurez hortícola colectados *in situ* en el banco de germoplasma del grupo GISeM ubicado en Huatusco, Veracruz.

Los frutos se cortaron en hojuelas, secados a 40° C con circulación de aire y macerados para estandarizar el tamaño de partícula. Se mezcló con metanol al 96% y se dejó reposar por 48 h a temperatura ambiente (20° C ± 2). La mezcla se decantó y se filtró por 12 ocasiones, renovando el disolvente hasta agotar los componentes solubles. Posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida para obtener el extracto crudo, finalmente se calcularon las diluciones empleando PBS.

PBS (Solución Buffer de fosfatos)

Esta solución de fosfato conserva la fisiología celular. Para preparar 1L.

- | | |
|---|--------|
| - Agua bidestilada | 1.0 L |
| - Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma, Chem, USA) | 8.0 g |
| - Cloruro de potasio (KCl) (Sigma, Chem, USA) | 0.2 g |
| - Fosfato monoácido de sodio (Na ₂ HPO ₄) (Sigma, Chem, USA) | 2.16 g |
| - Fosfato diácido de potasio (KH ₂ PO ₄) (Sigma, Chem, USA) | 0.2 g |

Las sales de NaCl, KCl y KH₂PO₄ se disuelven completamente una por una en 800 mL de agua bidestilada. Una vez disuelto todo se ajusta el pH de 7.2 – 7.4 con Na₂HPO₄ y se afora al volumen final de 1 L. Se vacía en botellas de vidrio para esterilizarlas por autoclave, dejar enfriar y almacenar a 4°C.

IMDM (Iscove's Modified Dubelcco's Medium)

Esta solución es el medio de cultivo para las líneas celulares. Para prepara 1 L.

- | | |
|--|------------------------|
| - Agua bidestilada | 1 L |
| - Iscove's | 1 sobre (17.7 g aprox) |
| - Bicarbonato de sodio (Na_2HCO_3) | 3.024 g |
| - Penicilina-Streptomicina | 0.031 g |

El sobre de IMDM se disuelve poco a poco en 800 mL de agua bidestilada, una vez disuelto completamente se adiciona el bicarbonato de sodio, se afora a 1 L y se deja en agitación por 15 min. La solución se filtra por medio de una membrana (Millipore) con diámetro de 0.22 μm , en un ambiente estéril.

Se vacía en botellas estériles, adicionar la Penicilina-Streptomicina y almacenar a 4°C.

SFB (Suero Fetal Bovino)

EL SFB se inactiva antes de usarse. Para la inactivación se deja a temperatura ambiente hasta su descongelación, posteriormente se pone en un baño de agua a 56°C por 30 min. y se homogeniza suavemente cada 10 min. Se separa en alícuotas de tubos estériles de 50 mL para un mejor manejo. Almacenar a 4°C.

Glutaraldehído al 1%

Este reactivo sirve para fijar las células que son evaluadas en la placa con la técnica de cristal violeta.

Se toman 1.57 mL de glutaraldehído (70% v/v) a un frasco ámbar, se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada y se agita suavemente. Esta solución se conserva a temperatura ambiente.

Cristal violeta

Es un colorante que tiñe al ADN de las células.

Se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, que se prepara al disolver 3.96 g de NaOH a 4.28 mL de ácido fórmico. Una vez preparada esta solución se adiciona 1 g de cristal violeta y se afora a 500 mL con agua bidestilada. Finalmente, la solución cristal violeta se filtra usando papel Whatman #2 y se almacena a temperatura ambiente.

Ácido acético al 10%

El ácido acético al 10% sirve para diluir el colorante de las células y ser evaluadas en un lector de placas. Para realizar 100 mL de solución, se toman 90 mL de agua bidestilada y se le agregan 10 mL de ácido acético glacial, y se obtiene ácido acético al 10%.

APÉNDICE II

Determinación de la IC₅₀ por regresión lineal

WEHI-3		
Tratamiento	Ecuación	IC50 µg/ml
<i>S. compositum</i>	$y = -35.389x + 82.94$ $R^2 = 0.7988$	0.93
<i>S. chinantlense</i>	$y = -151.81x + 96.789$ $R^2 = 0.9185$	0.3
<i>S. edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>	$y = -0.0622x + 99.282$ $R^2 = 0.988$	803.17

CMN-MO		
Tratamiento	Ecuación	IC50 µg/ml
<i>S. compositum</i>	$y = -25.94x + 96.92$ $R^2 = 0.8888$	1.8
<i>S. chinantlense</i>	$y = -10.224x + 86.01$ $R^2 = 0.7504$	3.53
<i>S. edule</i> grupo varietal <i>nigrum spinosum</i>	$y = -0.0234x + 94.738$ $R^2 = 0.955$	1992.9

Análisis de CBA's empleando el software FCP Array versión 3.0 (BD Biosciences, San José, CA) que facilita el análisis de los datos.

CBA's	
Citocina	R ²
TNF- α	0.99
INF- γ	0.99
MCP-1	0.98
IL-6	0.99

Regresión lineal para la técnica de ELISA

ELISA	
Citocina	Ecuación
GM-CSF	$y = 0.0038x + 0.0472$ $R^2 = 0.9973$
G-CSF	$y = 0.0008x + 0.0703$ $R^2 = 0.8721$
M-CSF	$y = 0.0006x + 0.0243$ $R^2 = 0.9711$