



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
CÁNCER

LABORATORIO DE HEMATOPOYESIS Y LEUCEMIA

**Proliferación y viabilidad de cocultivos de células
leucémicas WEHI-3 y normales de médula ósea de
ratón BALB/c en presencia de caseinato de sodio
(CasNa).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

LÓPEZ GARCÍA AIDE



DIRECTOR DE TESIS: **Dr. Edgar Ledesma Martínez**

México, D.F., 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, dentro de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM. Bajo la dirección del Dr. Edgar Ledesma Martínez.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de los programas SEP-CONACYT clave de proyecto 104025 y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con claves de proyecto IN225610 e IN220814.

Así mismo se contó con apoyo de becas de titulación para tesis de licenciatura CONACYT número de registro 18308 y COMECYT folio 13BTL0423.

Agradecimientos

A los miembros del jurado integrado por M. en C. Carlos Bautista Reyes, Dr. Edgar Ledesma Martínez, M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, Dr. Edelmiro Santiago Osorio y M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez; quienes con sus valiosos consejos y aportaciones guiaron la culminación exitosa del presente trabajo.

Al Dr. Edgar Ledesma Martínez por creer en mi cuando ni yo creía en mí, por estar siempre a mi lado en todo momento, por hacerme crecer en lo personal como en lo profesional, porque siempre estuvo allí para ser mi maestro, amigo, consejero, psicólogo; por no dejarme claudicar jamás.

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

A la maestra Itzen Aguiñiga por brindarme su amistad, paciencia y conocimientos, por darme la oportunidad de colaborar con otros proyectos de investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia.

Dedicatoria

A mis padres, María Dolores y Tomas, quienes con su incondicional apoyo, amor, comprensión, tiempo y sobre todo paciencia, me han guiado hasta este momento, para concluir una de mis principales metas en la vida, pues ustedes son el motor de mi vida.

A mis hermanos, Berenice, Diego y Clareth, quienes siempre han estado a mi lado para platicar, jugar, reír, llorar, sacándome una sonrisa en los momentos más difíciles, por aguantar mis momentos de locura y aun así continuar a mi lado.

A mis amigos, Luis Ángel M., Monserrat, Gloria, Froylan, Luis Armando, Luis Ángel H., Enrique, Arturo, Luis Antonio por brindarme una amistad excepcional e incondicional, por todos los gratos y no tan gratos momentos que vivimos juntos y por los cuales jamás me arrepentiré de habérmelos encontrado en esta vida.

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	6
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
Hematopoyesis.....	11
Microambiente hematopoyético.....	13
Desequilibrio en la hematopoyesis.....	14
Leucemia.....	14
Clasificación.....	15
Diagnostico e incidencia.....	16
Transfección.....	18
Alternativas de tratamiento.....	21
Caseína.....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	26
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL Y MÉTODO.....	29
Línea WEHI-3 de ratón.....	29
Animales.....	29
Obtención de células mononucleadas de médula ósea de ratón.....	29
Caseinato de sodio (CasNa).....	30
Proliferación.....	30
Viabilidad celular.....	30
Establecimiento de cocultivo de células WEHI-3GFP y CMN.....	31
Vector.....	31
Establecimiento de la dosis de selección con el antibiótico G418.....	32

Transfección de WEHI-3.....	33
Verificación de positividad para GFP	33
Análisis de fragmentación del ADN.....	34
RESULTADOS.....	36
CasNa inhibe la proliferación de WEHI-3, pero potencia la proliferación de CMN y CC, manteniendo la actividad metabólica.....	36
El antibiótico G418 inhibe la proliferación de las células leucémicas WEHI-3 de manera dosis dependiente, con una IC ₅₀ de 0.41mg/mL.....	38
Transfección con el vector pEGFP-C1 y seguimiento de las células leucémicas WEHI-3 transfectadas	40
Las células WEHI-3GFP son morfológicamente similares y responden a la presencia de CasNa de manera similar que las células WEHI-3, en evaluaciones de proliferación a 72h de cultivo.....	46
El CasNa inhibe la proliferación de las células leucémicas WEHI-3GFP pero potencia la de las células mononucleadas de médula ósea normal y del cocultivo de ambas....	49
El CasNa induce fragmentación del ADN en las células leucémicas WEHI-3GFP y cocultivo pero no en mononucleadas de médula ósea normal.....	52
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
APÉNDICE I	73
APÉNDICE II.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1. Representación esquemática de la jerarquización hematopoyética.

Figura 2. Esquema de lipofección.

Figura 3. Mapa del plásmido pEGFPC-1.

Figura 4. Porcentaje de proliferación de la línea celular leucémica mielomonocítica (WEHI-3), células hematopoyéticas normales de médula ósea (CMN) y el cocultivo de ambas (CC) en ausencia o presencia de 2mg/mL de CasNa después de 120 h de cultivo.

Figura 5. Actividad metabólica (viabilidad) de la línea celular leucémica mielomonocítica (WEHI-3), células hematopoyéticas normales de médula ósea (CMN) y el cocultivo de ambas (CC) en ausencia o presencia de 2mg/mL de CasNa después de 120 h de cultivo.

Figura 6. Efecto antiproliferativo inducido por Geneticina® (G418), sobre la línea celular leucémica mielomonocítica WEHI-3.

Figura 7. Ninguna combinación de optiMEM y SFB rinde más de 0.9% de células WEHI-3 positivas para GFP.

Figura 8. La combinación de DMEM y 0.1% de SFB rinde un máximo de 6.4% de células WEHI-3 positivas para GFP.

Figura 9. La combinación de IMDM y la ausencia de SFB rinde un máximo de 32.9% de células WEHI-3 positivas para GFP.

Figura 10. Expresión de GFP en las células WEHI-3GFP generadas con el plásmido pEGFPC-1 a) seis semanas después de la transfección y b) quince semanas post-transfección.

Figura 11. Expresión de GFP en las células WEHI-3GFP generadas con el plásmido pEGFPC-1 detectada mediante microscopia de fluorescencia.

Figura 12. La expresión de GFP en las células WEHI-3GFP generadas con el plásmido pEGFPC-1 es dependiente de la presencia de G418.

Figura 13. Comparación entre las células WEHI-3 y las transfectadas WEHI-3GFP.

Figura 14. CasNa inhibe la proliferación de WEHI-3 como de WEHI-3GFP. Evaluación de proliferación de las células WEHI-3 y WEHI-3GFP en ausencia o presencia de 2mg/mL de CasNa tras 72h de cultivo.

Figura 15. CasNa disminuye la viabilidad de WEHI-3 y WEHI-3GFP a 72 de cultivo. Evaluación de viabilidad de las células WEHI-3 y WEHI-3GFP en ausencia o presencia de 2mg/mL de CasNa tras 72h de cultivo.

Figura 16. Cultivos de las células WEHI-3GFP, células hematopoyéticas normales de médula ósea (CMN) y cocultivo de ambas (CCGFP) a las 120 horas de estímulo CasNa (2mg/mL) o PBS como vehículo.

Figura 17. Porcentaje de fluorescencia (GFP) en células WEHI-3GFP, CMN y el cocultivo de ambas (CCGFP) en ausencia o presencia de CasNa (PBS o CasNa respectivamente) a 120 h de cultivo. Histogramas representativos de un solo experimento.

Figura 18. Porcentaje de fluorescencia en células WEHI-3, WEHI-3GFP, CMN, cocultivo parental (CC) y el cocultivo de células mononucleadas y WEHI-3 GFP (CCGFP) en ausencia o presencia de 2 mg/mL de CasNa después de 120 h de cultivo.

Figura 19. Corrimiento electroforético de ADN de células WEHI-3GFP, CMN y cocultivo de ambas (CCGFP) en ausencia o presencia de 2 mg/mL de CasNa; (pb) marcador de peso molecular.

Tabla 1. Clasificación citomorfológica de las leucemias agudas.

Tabla 2. Comparativa de los genes reporteros que se utilizan con mayor frecuencia y la fuente, así como el sistema de detección y su estabilidad.

Tabla 3. Valores de IC_{50} , IC_{25} , IC_{10} (mg/mL) para la línea celular leucémica mielomonocítica WEHI-3.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico	LT-HSC	Célula hematopoyética troncal reconstituyente a largo plazo*
AML	Leucemia mieloide aguda	MDS	Síndrome mielodisplásico*
ATCC	American Type Culture Collection*	MEP	Progenitor megacariocito/eritroide común*
ATRA	Acido todo transretinoico*	mg	Miligramo
BALB/c	Cepa de ratón de laboratorio	mL	Mililitro
cADN	Acido desoxirribonucleico complementario	MO	Médula ósea
CasNa	Caseinato de sodio	MPM	Marcador de peso molecular
CC	Cocultivo de células WEHI-3 y CMN	MPP	Progenitor multipotente*
CCGFP	Cocultivo de células WEHI-3GFP y CMN	NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido*
CLP	Progenitor linfoide común*	NK	Célula asesina natural*
CMN	Células mononucleadas de médula ósea	nm	Nanómetro
CMP	Progenitor mieloide común*	OptiMEM	Reduced Serum Media modification of Eagle's Minimum Essential Media*
CMV	Citomegalovirus	P388	Línea celular macrofagica
CO₂	Dióxido de carbono	PBS	Buffer de fosfatos salino*
DEPC	Dietilpirocarbonato	pH	Potencial de hidrogeno
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium*	Pro-B	Progenitor de linfocitos B*
FAB	Grupo cooperativo Franco-Americano-Británico	Pro-T	Progenitor de linfocitos T*

FACS	Separación de células activadas por fluorescencia*	rmIL-3	Interleucina 3 recombinante de ratón*
G418	Geneticina (antibiótico de selección)	rpm	Revoluciones por minuto
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos*	SFB	Suero fetal bovino
GFP	Proteína verde fluorescente*	SP	Sangre periférica
GMP	Progenitor granulocito/macrófago*	ST-HSC	célula hematopoyética troncal reconstituyente a corto plazo*
HSC	Célula troncal hematopoyética*	TBE	Triacidoborico-EDTA
IC₅₀	Concentración de inhibición media*	Tn5	Transposon 5 resistencia a neomicina/kanamicina
IL	Interleucina*	WEHI-3	Línea celular leucémica mielomonocítica de ratón Balb/c
IMDM	Iscove's Modified Dulbeco's Médium*	WEHI-3GFP	Línea celular leucémica mielomonocítica de ratón Balb/c que expresa GFP
J774	Línea celular macrofagica	µg	Microgramo
Kb	Kilobase	µL	Microlitro
LLA	Leucemia linfocítica aguda	µM	Micromolar
LMC	Leucemia mieloide crónica	°C	Grado centígrado

**por sus siglas en ingles*

RESUMEN

El sistema hematopoyético muestra un amplio espectro de poblaciones celulares cuya constante proliferación y diferenciación en la médula ósea da lugar a las células sanguíneas. Sin embargo un desequilibrio en este sistema da origen a problemas hematológicos entre ellos la leucemia mieloide aguda (AML), la cual es una enfermedad clonal consecuencia de una hematopoyesis aberrante caracterizada por la acumulación de células blásticas que no se diferencian normalmente. Tratamientos como la quimioterapia actúan sobre las células malignas pero también son citotóxicos sobre células normales, incluyendo las hematopoyéticas lo que compromete la vida del paciente; por lo que, es innegable la necesidad de desarrollar un agente antineoplásico con actividad hacia células malignas, pero carente de toxicidad para los tejidos normales. Desafortunadamente, los estudios de drogas con potencial antileucémico se centran principalmente en los efectos farmacológicos sobre poblaciones de AML, mientras que por otro lado es poco conocido el efecto de estas drogas sobre las células de médula ósea; una de las principales limitantes es que las células leucémicas comparten muchas características con las células hematopoyéticas sanas tanto morfológicas como de inmunofenotipo, por esta razón en este trabajo la línea celular mielomonocítica WEHI-3 fue transfectada a fin de que expresase la proteína verde fluorescente, para así poder distinguirla de las células hematopoyéticas normales de médula ósea de ratón en cultivo. Se evaluó la presencia y viabilidad de células leucémicas WEHI-3GFP en un cocultivo (CCGFP) con células hematopoyéticas normales (CMN), en ausencia y presencia de caseinato de sodio (CasNa). Los resultados muestran que CasNa inhibe la proliferación e induce apoptosis en las células leucémicas WEHI-3GFP pero no en las CMN. De modo interesante, el CCGFP de WEHI-3GFP y CMN en presencia de CasNa, muestra similitudes en proliferación y actividad metabólica respecto a cultivos individuales de CMN pero no de células leucémicas WEHI-3GFP, lo que sugiere un efecto citotóxico selectivo de CasNa sobre las células leucémicas. Con respecto a esos resultados es conocido que las moléculas antileucémicas en uso para tratar AML (antraciclina, daunorubicina) o en investigación (resveratrol, ácido betulínico, curcumina), son más citotóxicas sobre células leucémicas que sobre células hematopoyéticas normales, pero hasta el momento no se ha descrito que alguna induzca la proliferación de células normales como lo hace el CasNa, una propiedad al parecer exclusiva de este, por lo que supera las expectativas de cualquier anticancerígeno en investigación.

INTRODUCCIÓN

Hematopoyesis

Día a día el organismo debe remplazar millones de células sanguíneas maduras para su correcto funcionamiento, ya sea para que se 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 (Yin & 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 (MO) (Zambrano *et al.*, 1999). Durante la etapa adulta del individuo y debido al incremento en el número de las células adiposas en ciertas regiones de la medula, 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 (Bellantuono, 2004; Hughes *et al.*, 1991).

La hematopoyesis puede ser esquematizada en forma de cascada (Figura 1) de manera que dependiendo del grado de maduración celular podemos observar cuatro compartimientos principales; el primer compartimiento pertenece a las HSC las cuales se definen como células inmaduras, con gran potencial de proliferación, capacidad de autorenovación, de diferenciación en células sanguíneas especializadas y de reconstruir el sistema hematopoyético de un individuo mielosuprimido (Chotinatakul & Leeansaksiri, 2012; Wintrobe, 2009; Orkin & Zon, 2008; Mayani *et al.* 2007; Mayani, 2003), constituyen del 0.005 al 0.01% del total de las células nucleadas de la MO (Pelayo y Vadillo, 2011; Thomas *et al.*, 1999). Las HSC se encuentran en estado quiescente en la médula ósea (MO) y se dividen solo para mantener el estado normal de la hematopoyesis (Cheshier *et al.*, 1999)

Debido a su potencial de reconstitución las HSC pueden ser divididas en células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo (LT-HSC) y células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a corto plazo (ST-HSC), ambas tienen la capacidad de dar lugar a cualquier linaje sanguíneo, sin embargo las primeras son capaces de sostener la hematopoyesis de un individuo toda su vida, en cuanto a las segundas solo pueden mantenerla entre 8 a 16 semanas (Montrone

et al., 2013; Shuettpeiz & Link, 2013; Mayle *et al.*, 2012; Benveniste *et al.*, 2010; Challen *et al.*, 2010; Orkin & Zon, 2008; Weisman, 2000). Las células progenitoras multipotentes (MPP) las cuales son la progenie directa de las LT-HSC, ST-HSC, han perdido su capacidad de autorenovación y por lo tanto su capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético a largo plazo pero conservan un alto grado de proliferación y diferenciación a todos los linajes sanguíneos (Metcalf, 2008). A partir de estos progenitores multipotentes se derivan los progenitores linfoides comunes (CLP) y los progenitores mieloides comunes (CMP), este es el tercer compartimiento y a este pertenecen más del 90% de las células residentes en la MO. De los CMP se originan los progenitores de eritrocitos y megacariocitos (MEP) y los progenitores de granulocitos-macrófagos (GMP). Los CLP darán origen a los progenitores de linfocitos B (Pro-B), progenitores de linfocitos T (Pro-T) y los progenitores de células asesinas naturales (Pro-NK). Ambos, CMP y CLP pueden dar origen a los progenitores de células dendríticas (Pro-CD), una vez que estos maduran completamente darán lugar al cuarto compartimiento que son las plaquetas, eritrocitos, granulocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B y células asesinas naturales (Pelayo y Vadillo, 2011; Mayani *et al.*, 2007).

Las células troncales hematopoyéticas, ya sean HSC, MPP, CLP o CMP, no pueden ser identificadas morfológicamente bajo el microscopio, sin embargo, estas pueden ser identificadas mediante antígenos específicos de cada población, lo cual es conocido como inmunofenotipo. El inmunofenotipo puede ser evaluado por microscopia de epifluorescencia o citometría de flujo, debido a que existen inmunofenotipos específicos para cada tipo y linaje celular tanto para ratón como para humano (Tárnok *et al.*, 2010; Bellantuono, 2004; Spangrude *et al.*, 1988).

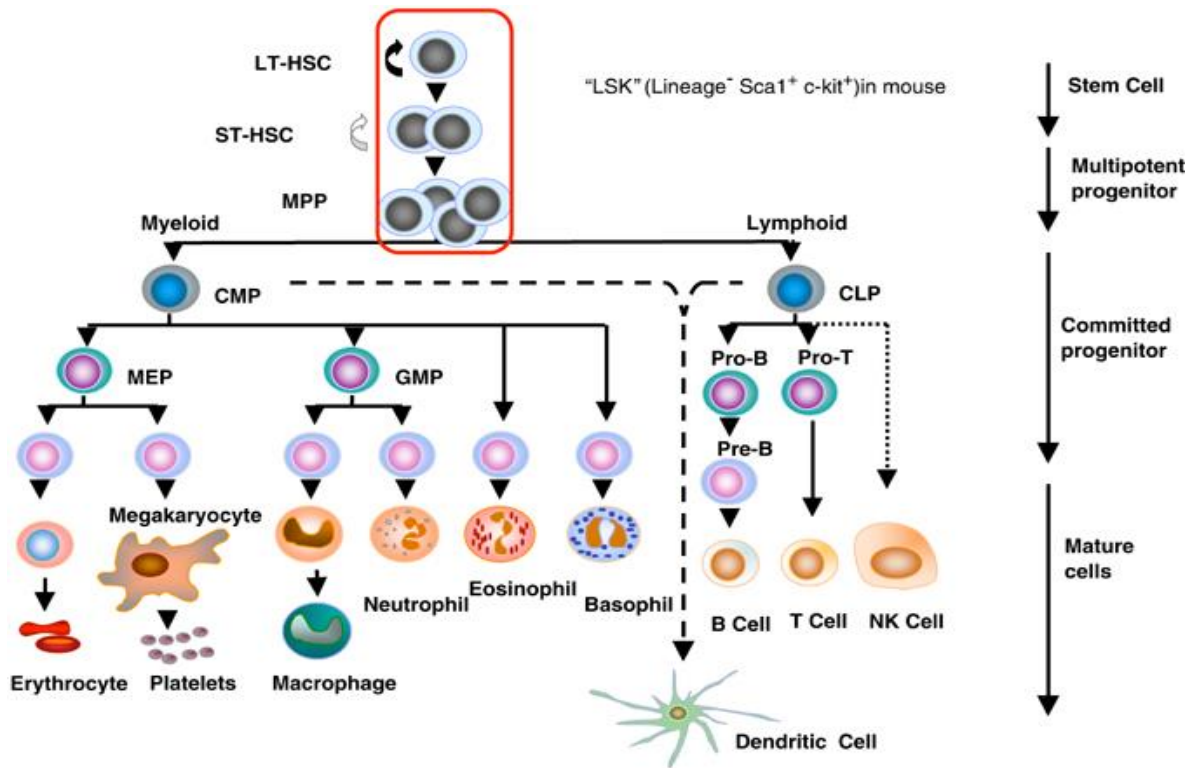


Figura 1. Representación esquemática de la jerarquización hematopoyética. LT-HSC (célula troncal hematopoyética a largo plazo), ST-HSC (célula troncal hematopoyética a corto plazo), MPP (progenitora multipotente), CMP (progenitor mieloide común), CLP (progenitor linfocítico común), MEP (progenitor megacariocito/eritocito común), GMP (progenitor granulocito/macrófago), Pro-B (progenitor B), Pro-T (progenitor T), NK (Asesinas naturales). Tomado de Larsson & Karlsson, 2005.

Microambiente hematopoyético

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, este es el lugar en donde se lleva a cabo la hematopoyesis (Domínguez, 2012).

Las HSC residen en la MO en un ambiente tridimensional altamente organizado compuesto por una población de diversas células del estroma y una matriz extracelular rica en fibronectina, colágeno y diversos proteoglicanos (Pusic & Dispersio, 2008; Nervi *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2003). No obstante además de sus dimensiones microanatómicas y funcionales del nicho, las funciones fisiológicas de las HSC son controladas por diversas combinaciones de mecanismos de regulación tanto intrínsecas como extrínsecas, mediante moléculas que les permiten su completa y constante regulación; la combinación de todos estos factores le dan al nicho hematopoyético su característica principal la cual es mantener un compartimento de HSC en su estado indiferenciado (Can, 2008)

Desequilibrio en la hematopoyesis

El desequilibrio en la hematopoyesis se traduce en serios problemas hematológicos, por ejemplo en enfermedades neoplásicas incluidos los síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos, cuyo carácter distintivo a nivel de crecimiento lo constituye la proliferación aberrante de tipo clonal (David, 2005; Honry *et al.*, 1990). Se ha reportado que el cáncer se ha convertido en la principal causa de muerte a nivel mundial a partir de 2010 y su pronóstico es que sus valores incrementarán en los próximos 20 años (Siegel *et al.*, 2013) dentro de este panorama la leucemia se encuentra dentro de los primeros cinco tipos de cáncer más frecuente y con más alta mortalidad a nivel mundial (Tima *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2014; Ferrara & Schiffer, 2013).

Leucemia

Dentro de los diversos tipos de cáncer la leucemia es un tipo de cáncer de las células sanguíneas iniciado por la mutación de una célula hematopoyética del compartimento troncal. La progenie clonal de esta célula mutada constituye una población heterogénea en la cual la proliferación y diferenciación desregulada, inducen una acumulación de células blásticas no funcionales (Jaso *et al.*, 2014; Stone *et al.*, 2004; Bruserud *et al.*, 2004). Como otros tipos de cáncer, la ontogenia de la leucemia es un proceso multipaso de alteraciones genéticas mediante las cuales, las células normales adquieren una sucesión de capacidades distintivas, como son: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de la proliferación, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis, que en

última instancia les permite convertirse en tumorigénicas y malignas (Kushlinskii & Nemtsova, 2014; Hannahan & Weinberg, 2000). Otra característica es que todas las leucemias comienzan en la médula ósea (MO), la cual es sustituida de forma indeterminada por la proliferación anormal de células neoplásicas. Estas células neoplásicas salen de la MO y se dirigen a sangre periférica, en donde se presentan en gran cantidad, lo que resulta en la representación clínica de la enfermedad (Fimognari *et al.*, 2014).

Clasificación

La leucemia se divide en dos grandes grupos: crónica y aguda; éstas a su vez se clasifican en mieloides y linfoideas dependiendo del progenitor celular del que se derive. Las leucemias crónicas se caracterizan por su larga evolución y por la ausencia de células inmaduras y anormales. Estas células interfieren en la producción de linfocitos y granulocitos que presentan características morfológicas similares a células maduras pero no son funcionales (Kantarjian *et al.*, 1988) y son: leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia mieloide crónica (LMC). Las leucemias agudas son enfermedades caracterizadas por su evolución relativamente rápida y por la acumulación de células blásticas, pudiendo ser ocasionada por una o varias mutaciones de una célula progenitora hematopoyética, o bien de sus descendientes; este tipo de leucemia se clasifica en leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA) (Gutiérrez, 2006).

De acuerdo con el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) se clasifican citomorfológicamente de la siguiente manera (Tabla 1).

Linaje mieloide "LMA"
M0= Indiferenciada
M1= Mieloblástica sin maduración
M2= Mieloblástica con maduración
M3= Promielocítica
M4= Mielomonocítica
M5= Monoblástica/monocítica
M6= Eritroleucemia
M7= Megacarioblástica

Tabla 1. Clasificación citomorfológica de las leucemias agudas. Tomado y modificado de Bereridge & Urtasun, 2003.

Diagnostico e incidencia

El diagnóstico de LMA, se basa en criterios morfológicos, características inmunológicas, citogenéticas y moleculares (Robak *et al.*, 2009). Clínicamente los síntomas y signos que presentan los pacientes con leucemia son variados, entre ellos son comunes, la insuficiencia medular evidenciada por leucopenia, invasión de células blásticas a órganos extramedulares, coagulopatías, leucocitosis, leucostasis, aparición de uno o de varios tumores sólidos a menudo descritos como sarcomas granulocíticos, trastornos metabólicos relacionados con la proliferación, entre otros (Gimenez, 1986). A partir de la década de los setenta, la leucemia aguda y los síndromes mielodisplásicos (MDS) se han definido y clasificado de acuerdo con las recomendaciones del grupo FAB. Actualmente, estas clasificaciones están siendo sustituidas por las de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicadas en 2001, las cuales son mucho más amplias en sus objetivos e incluyen trastornos mieloproliferativos y linfoproliferativos crónicos (Vardiman *et al.*, 2009). La aplicación de los criterios de la OMS requiere conocer los resultados de los análisis de inmunofenotipificación y citogenéticos, lo que en conjunto con las características morfológicas, se utilizan para establecer el linaje y estado de maduración de las células neoplásicas. Al mismo tiempo, el porcentaje de blastos permite de manera práctica, categorizar el tipo de neoplasia mieloide y predecir su progresión. En este sentido, una neoplasia mieloide se considera como LMA cuando 20 % o más de blastos aparecen en sangre periférica (SP) MO. En algunos casos, el diagnóstico de LMA puede prescindir del recuento de blastos en SP o MO, por ejemplo cuando está asociado con anomalías genéticas específicas y el umbral de blastos de 20% puede no ser un mandato para tratar al paciente como LMA (Vardiman, 2009).

La incidencia de LMA aumentan con la edad, con una media de diagnóstico de entre 65 y 75 años de edad siendo el tipo más común de leucemia en los adultos, representando aproximadamente el 25% de todas las leucemias en adultos en el mundo occidental (Cheng *et al.*, 2014; Deschler & Lübbert 2006). El tratamiento para la LMA incluye al menos un curso de quimioterapia de inducción intensiva, seguido por un curso adicional de terapia de consolidación intensiva y terapia de mantenimiento. 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 (Hsiao *et al.*,

2014; Jaso *et al.*, 2014). Es este sentido, a pesar del progreso sustancial en el tratamiento, el 20% a 40% de los pacientes recién diagnosticados con LMA no logran la remisión y 50% a 70% de aquellos en primera remisión completa se espera que recaigan dentro de los 3 años siguientes. Además existen pacientes que no son candidato a las estrategias convencionales, por ejemplo el trasplante autólogo y alogénico de células troncales (Cheng *et al.*, 2014; Robak *et al.*, 2009), no pueden acceder al tratamiento en términos económicos (Ruiz-Argüelles *et al.*, 2007), o han dejado de ser responsivos.

Por lo anterior, cada año nuevos medicamentos son evaluados en estudios clínicos, incluyendo inmunotoxinas, anticuerpos monoclonales, análogos de los nucleósidos, agentes hipometilantes, inhibidores de la farnesiltransferasa, agentes alquilantes, inhibidores de la tirosina quinasa 3 y moduladores multi-resistentes (Tallman *et al.*, 2005). Por otro lado, la búsqueda de moléculas potencialmente antineoplásicas reside en los modelos de ratón los cuales, buscan emular las enfermedades humanas que de otra manera, serían muy difícil o éticamente reprobable abordar experimentalmente. Uno de los modelos de ratón más ampliamente utilizados en el estudio de la leucemia mieloide es el de las células WEHI-3, derivadas de un ratón Balb/c por el grupo de Donald Metcalf hace más de 40 años (Sarabani *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2002; Van Furth 1985; Warner *et al.*, 1969). Es conocido que la inoculación de esta línea celular a ratones compatibles, induce tumores y un cumulo de manifestaciones de enfermedad de recuerdan a la LMA en humanos y que culminan invariablemente en la muerte (Ling *et al.*, 2006; García-Castro *et al.*, 2003). Desafortunadamente, no se ha descrito el inmunofenotipo preciso de las células WEHI-3 de manera que su identificación tanto *in vitro*, por ejemplo en cocultivos como *in vivo*, en la médula ósea y órganos torácico-abdominales después de su inoculación a ratones compatibles, es poco referida. Una alternativa para la identificación de células *in vitro* e *in vivo*, en ausencia de un inmunofenotipo preciso o de lesiones cariotípicas es el marcaje celular, ya sea con moléculas fluorescentes o mediante la transfección de un vector que exprese de manea constitutiva un gen reportero.

Transfección

La transfección o transgénesis es la introducción de material genético externo en células eucariotas por medio de plásmidos, virus u otras herramientas moleculares (Legorreta *et al.*, 2012). El desarrollo de los métodos de transferencias de genes inició desde los años cincuenta, cuando se describió el ciclo lisogénico de los bacteriófagos cuyo genoma se integra establemente en la bacteria huésped y se replica junto con ella. La posterior descripción de elementos hereditarios no asociados con el cromosoma como los plásmidos, que en algunos casos se pueden insertar de forma estable en el genoma (episomal), posibilitó la transformación artificial de organismos unicelulares y promovió la invención de métodos artificiales de transferencia de genes (Legorreta *et al.*, 2012).

En la transfección se han seleccionado moléculas específicas para la entrega de genes, denominadas vectores (Armenta *et al.*, 2006); los vectores típicamente consisten en un ácido nucleico asociado con un material, ya sea natural (por ejemplo los basados en virus) o sintéticos (por ejemplo a base de polímeros o lípidos) (Bergen *et al.*, 2011). Los vectores virales ofrecen una forma atractiva de introducir ADN en las células huésped con alta eficiencia debido a sus capacidades de transferencia de genes y expresión génica; sin embargo las desventajas de utilizar vectores virales es que algunas proteínas virales pueden ser tóxicas para las células, otro inconveniente de este tipo de vectores, es que la expresión de algunas proteínas virales pueden favorecer la respuesta inmune intensa contra las células diana (Legorreta *et al.*, 2012; Bergen *et al.*, 2011). La utilidad clínica de los vectores virales está a menudo limitada por los patrones naturales de transducción de virus, y en muchos casos sus interacciones desfavorables con el sistema inmune (Bergen *et al.*, 2011). Los vectores no virales tienen varias ventajas sobre los vectores virales en particular desde el punto de vista de la seguridad y su producción comercial. Sin embargo, la baja eficiencia de la transferencia de genes mediada por vectores no virales sigue siendo un obstáculo (Akita *et al.*, 2011; Tros de Ilarduya *et al.*, 2010). El tipo de vector más empleado es el plasmídico (molécula circular de ADN de doble cadena), que se replica de forma independiente en la bacterias. Una desventaja de los métodos físicos actuales es que están limitados a aplicaciones *in vitro* (Armenta *et al.*, 2006).

Los genes reporteros cumplen el propósito de expresar alguna proteína cuya función se detecte fácilmente y sirven además para identificar a la transgénesis en el tiempo y en el espacio. Un gen reportero idealmente requiere codificar para una proteína cuya actividad endógena en la célula blanco, sea nula o muy baja; o que se distinga fácilmente de la célula huésped. Además no debe ser tóxico para las células y se prefiere que pueda medirse sin destruir al tejido (detección no invasiva), para poder observar el curso temporal de la expresión, sin que esto impida utilizar las células para otros fines posteriormente. Su detección debe ser simple y muy sensible, por lo que generalmente se utilizan fluoróforos o enzimas que generen cromógenos como reporteros (Legorreta *et al.*, 2012; Read, 2000). Los reporteros utilizados con mayor frecuencia se describen en la Tabla 2. La proteína verde fluorescente ha sido expresada en una amplia variedad de organismos y solo necesita luz ultravioleta o luz azul para su detección. La expresión de GFP es autónoma independiente del tipo de célula y su ubicación (Sheen *et al.*, 1995; Read, 2000).

Reportero y fuente	Sistema de detección	Actividad endógena	Estabilidad
Proteína verde fluorescente (GFP)	Fluorescencia, FACS, microscopía con focal. No invasivo	Nula	Alta resiste fijación
Galactosidasa de <i>E. coli</i>	Colorimétrico. invasivo	Presente a pH ácido y en senescencia	Alta resiste fijación. Resiste pH 7.5- 8.0
Luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>	Luminiscente. Emite un fotón al hidrolizar ATP. No invasivo	Nula	Baja
Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) de <i>E. coli</i>	Detección de formas acetiladas de cloranfenicol. Invasiva	Nula	Alta, resiste detergentes
Glucoronidasa de <i>E. coli</i>	Quimioluminiscencia, fluorescencia, espectrofotometría e histoquímica. Invasiva	Muy baja en plantas	Muy estable a 37°C, resiste hasta 60°C
Fosfatasa alcalina humana	Espectrofotométrica. Invasiva	Presente	Estable
Hormona del crecimiento humana	Radioinmunoanálisis o ELISA	Nula	Estable

Tabla 2. Comparativa de los genes reporteros que se utilizan con mayor frecuencia y la fuente, así como el sistema de detección y su estabilidad (Legorreta *et al.*, 2012)

Existen diversos métodos físicos y químicos para la eficiente introducción del ADN con su propio espectro de ventajas y desventajas. Entre los factores a considerar para un procedimiento óptimo de transfección no viral en eucariontes están: el blanco, la ventana de tiempo, el nivel de expresión deseado, la estabilidad esperada así como la factibilidad de la técnica (Legorreta *et al.*, 2012; Karra *et al.*, 2010). Entre las diferentes metodologías (biobalística, electroporación, microinyección, precipitación por fosfato de calcio, etc.) destaca la lipofección en términos de mayor eficiencia y reproducibilidad, además de no presentar desventajas como citotoxicidad, dificultades técnicas y equipamiento necesario (Ramos *et al.*, 2005).

La lipofección, emplean vesículas sintéticas consistentes de una o más bicapas de fosfolípidos llamadas de manera genérica: *liposomas* (Gregoriadis *et al.*, 2010; Ewert *et al.*, 2008). Los liposomas tienen varias características que los hacen ser atractivos como vectores para la transferencia de genes: no son inmunogénicos, no son tóxicos, los liposomas como transportadores de ADN pueden transfectar células que no se dividen (incluyendo neuronas), pueden entregar múltiples genes de cualquier tipo de ácido nucleico (lineal o súper enrollado) y finalmente son relativamente sencillos de preparar (Wang *et al.*, 2013; Ibáñez *et al.*, 1996).

Las propiedades antes mencionadas posicionan a los liposomas como un buen método para transferir genes. Adicionalmente se han diseñado liposomas con lípidos catiónicos que son lípidos sintéticos (Koch *et al.*, 2000). Los lípidos catiónicos tienen la propiedad de interactuar con las cargas negativas del ADN y formar lipocomplejos catiónicos, que en su momento interactúan con las cargas negativas de las membranas celulares, lo que favorece su introducción a la célula por endocitosis (Figura 2) (Fewell *et al.*, 2005; Wong, 2008)

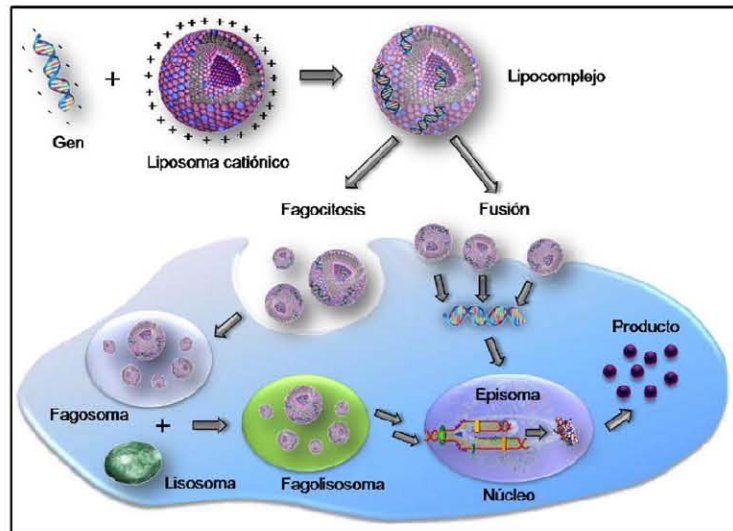


Figura 2. Esquema de lipofección. El lipocomplejo que lleva el transgen penetra a la célula por endocitosis o por fusión, en ambos casos el transgen llega al núcleo, permanece como episoma y expresa la proteína o producto (Wong, 2008).

Alternativas de tratamiento

La necesidad de promover la búsqueda de medicamentos de origen natural, surge por el incremento en la frecuencia de padecimientos mortales como el cáncer. Hoy por hoy, existen en el mercado de Estados Unidos de América (EUA) 141 medicamentos contra el cáncer y aproximadamente el 67% de éstos son de origen natural. (Cragg *et al.*, 2005). Estos medicamentos se han clasificado como; productos de origen natural, productos semisintéticos derivados de un producto natural o productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural (Cragg *et al.*, 2005). En este sentido, la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM, desde hace más de 10 años ha impulsado la investigación de nuevas moléculas potencialmente anticancerígenas de origen natural entre ellas la caseína y el caseinato de sodio (CasNa).

Caseína

La leche y sus productos lácteos son uno de los principales componentes dentro de la dieta humana aun en etapa adulta y es valorado por su aporte nutricional de aminoácidos (Koletzko *et al.*, 1998). La leche está constituida por 3.6% de proteínas, 4.0% de grasas, 5.0% de carbohidratos, menos del 1.0% de vitaminas y minerales y 86.6% de agua. El 80% de la fracción proteica la constituye la caseína α -S1 caseína, α -S2 caseína, β caseína y κ caseína (Warner, 1979; Hall, 1971).

Si bien las citosinas son los principales reguladores de la hematopoyesis, existen evidencias de que estas glicoproteínas no son las únicas que pueden influir en la generación de células sanguíneas, así existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta de las citosinas que pueden tener efectos similares sobre las células hematopoyéticas. En este sentido, diferentes estudios han surgido que las proteínas de la leche pueden estar involucradas en procesos hematopoyéticos más allá del soporte de aminoácidos. En efecto, la eliminación de caseína en la dieta de ratas y ratones provoca mielosupresión (Stanovic & Boranic, 1996) y por el contrario una dieta privada de proteínas pero suplementada con caseínas favorece la hematopoyesis *in vivo* (Aschkenasay, 1971). Es conocido que su eliminación de la dieta en ratones induce una proliferación deficiente de eritrocitos a consecuencia de la reducción en la producción de eritropoyetina (Okano *et al.*, 1992). Por otro lado, la inyección intraperitoneal de CasNa además de inducir quimiotaxis de granulocitos y monocitos (Pasotti *et al.*, 1992), lo cual se ha empleado con éxito para estudiar la inflamación de manera controlada, también induce acumulación de actividad estimuladora de colonias en suero y exudado de la cavidad peritoneal (Metcalf *et al.*, 1986; Sachs & Lotem, 1993). La inyección subcutánea de caseína permite la supervivencia de ratones inyectados con dosis letales de bacterias, actividad que se debe a la elevación de los niveles del G-CSF el cual activa a los granulocito-neutrófilos para eliminar a las bacterias (Ledesma-Martínez, 2013) acelerando la diferenciación de neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares en ratón (Santiago-Osorio *et al.*, 2010). Así mismo, el CasNa induce activación de hematopoyesis al incrementar el número de células mononucleadas de la médula ósea *in vivo* (Donahue *et al.*, 1986), e inducir un aumento de los precursores de origen mieloide en la médula ósea de ratón (Liebermann & Hoffman-Liebermann, 1989).

Por otro lado, se ha sugerido que la caseína, o algunos de sus componentes, productos de la digestión enzimática, pueden ser biomoléculas reguladoras de la hematopoyesis más allá del aporte de aminoácidos (Okano *et al.*, 1992; Cross & Gill, 2000). A este respecto se ha encontrado

que las subunidades α , β y κ caseína, constituyentes de la caseína, contienen un número importante de péptidos bioactivos, para los que existen receptores en las células mieloides, tanto normales como de origen leucémico (Read *et al.*, 1990; Jinsmaa & Yoshikawa, 1999). Así mismo se han dado evidencias de la presencia de receptores para caseína y CasNa, en granulocitos y monocitos (Lewis & Van Epss, 1983; Hira *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que la β -caseína activa la producción de radicales libres en granulocitos e induce la proliferación de linfocitos de carnero (Wong *et al.*, 1996) y de linfocitos T de pacientes con diabetes tipo I y II (Cavallo *et al.*, 1996), mientras que péptidos derivados de la caseína pueden estimular o disminuir la actividad de linfocitos (Kayser & Meisel, 1996; Pessi *et al.*, 2001).

Todos estos elementos muestran que moléculas y péptidos de la caseína pueden incidir en la regulación de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas normales, así como también en aquellas de origen leucémico; teniendo por lo tanto aplicación terapéutica potencial. En este sentido, recientemente se reportó que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína, inhibe la proliferación de diferentes líneas celulares leucémicas entre ellas, WEHI-3, J774 y P388 tanto *in vitro* como *in vivo* (Córdova-Galaviz *et al.*, 2014; Ramos-Mandujano *et al.*, 2008). De manera interesante, el efecto biológico del CasNa sobre células hematopoyéticas, es mayor al ejercido por las subunidades de caseína de manera individual en el mismo tipo de células (Ramos-Mandujano *et al.*, 2008). Por otro lado en cultivo primario de células de médula ósea, el CasNa sinergiza la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal (CMN) de ratones presencia de interleucina 3 recombinante de ratón (rmIL-3) como factor de crecimiento (Ledesma-Martínez *et al.*, 2012) mientras que al ser administrado intraperitonealmente a un ratón BALB/c sano, además de incrementar el índice esplénico, aumenta también el tamaño de los centros germinales (Lagunez, 2004) y recientemente se publicó que se promueve la granulopoyesis (Domínguez *et al.*, 2012) induce proliferación celular (Ledesma-Martínez *et al.*, 2012).

Es conocido que el interés de un agente potencial anti-cáncerígeno, no sólo depende de su actividad hacia células malignas, sino también de su falta de toxicidad para los tejidos normales (Lickliter *et al.*, 2003). En este sentido y de nuestro conocimiento, el CasNa representa la primera descripción de una molécula tóxica para las células leucémicas, pero que induce proliferación en células hematopoyéticas normales. Esta propiedad opuesta es rara entre la mayoría de los fármacos utilizados en el tratamiento de leucemia y excede las expectativas de cualquier molécula antileucémica actualmente en investigación, sin embargo, se desconoce si en un cocultivo de

células normales y células leucémicas, el CasNa mantiene su capacidad de activar la hematopoyesis normal al mismo tiempo que inhibe la hematopoyesis leucémica. De confirmarse que el CasNa conserva su actividad diferencial en cocultivo, se sentarían las bases para proponerlo como una molécula con potencial de tratamiento o purga de células leucémicas *ex vivo* en pacientes con leucemia.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar del avance en el conocimiento de la biología celular, molecular y bioquímica aplicada al tratamiento de la AML, se encuentra dentro de los primeros cinco tipos de cáncer más frecuente y de alta mortalidad a nivel mundial. Tratamientos como la quimioterapia actúan sobre las células malignas pero también en normales, incluyendo las hematopoyéticas, lo que compromete la vida del paciente, por lo que es innegable la necesidad en desarrollar un agente antineoplásico con actividad hacia células malignas, pero carente de toxicidad para los tejidos normales. En este sentido, los productos de origen natural o derivados de estos han sido desde tiempos inmemoriales, la fuente principal del hombre para la obtención de agentes medicinales. (Setzer y Setzer, 2003). Desafortunadamente, los estudios de drogas con potencial antileucémico se centran principalmente en los efectos farmacológicos sobre poblaciones de AML, mientras que por otro lado es poco conocido el efecto de estas drogas sobre las células de médula ósea; la lentitud de los avances en la investigación sobre la interacción entre las células leucémicas y células de médula ósea se debe gran parte a la dificultad de estudiar a estas células en un sistema *ex vivo* (Griessinger *et al.*, 2014); por lo que el cocultivo representa un método cuya finalidad es emular *in vitro* la compleja interacción entre células leucémicas y normales de la médula ósea como ocurre *in vivo*, y por ende aumentar el rendimiento de las investigaciones en diversos campos científicos disminuyendo costos y aminorar tiempos (Kvestad *et al.*, 2014)

JUSTIFICACIÓN

La LMA tiene la tasa de supervivencia más baja de todas las leucemias (Robak *et al.*, 2009). La estrategia terapéutica ideal es aquella que elimina a las células malignas sin dañar a las células normales. Por lo anterior, existe la necesidad de encontrar moléculas alternativas con potencial terapéutico pero sin los efectos colaterales de la quimioterapia estándar.

Hasta el momento, se ha conseguido que nuevas moléculas de origen natural sean altamente efectivas contra células malignas y ligeramente tóxicas para el tejido normal (Wright *et al.*, 2013; Faujan *et al.*, 2010), de entre ellas, el caseinato de sodio, es un candidato muy interesante de investigación gracias a que se ha mostrado, es una molécula tóxica para las células leucémicas, pero inocua para sus contrapartes normales de la médula ósea en las que incluso induce proliferación celular. En la médula ósea de un paciente con leucemia coexisten ambos tipos de células, por lo tanto es importante demostrar que el efecto diferencial de CasNa, se conservaba en un cocultivo de células mononucleadas normales y leucémicas WEHI-3GFP.

HIPÓTESIS

Se ha mostrado que el CasNa frena la proliferación de líneas celulares leucémicas de ratón, mientras que potencia la proliferación y diferenciación de células normales de médula ósea. Por lo anterior, se espera que en el cocultivo de células leucémicas y normales de médula ósea, el CasNa bloqueará la generación de células leucémicas en tanto que estimulará la de células hematopoyéticas normales.

OBJETIVOS

General

- ❖ Evaluar la proliferación y viabilidad de WEHI-3, células mononucleadas normales de médula ósea de ratón (CMN) y cocultivo de ambas (CC) estimuladas con CasNa.

Particulares

- ❖ Establecer en WEHI-3 la dosis para seleccionar las clonas de WEHI-3GFP+ con el antibiótico Geneticina.
- ❖ Transfectar a las células WEHI-3 con el gen reportero GFP.
- ❖ Verificar que la transfección no modifique las características propias de la línea celular leucémica WEHI-3.
- ❖ Evaluar el efecto del caseinato de sodio en la proliferación y viabilidad de cocultivos de células leucémicas WEHI-3GFP y normales de médula ósea de ratón BALB/c.
- ❖ Evaluar el efecto del CasNa sobre la fragmentación del ADN de WEHI-3GFP, CMN y CC.

MATERIAL Y MÉTODO

Línea WEHI-3 de ratón

Se empleó la línea de leucemia mielomonocítica WEHI-3 de ratón (ATCC Rockville, MD, USA), originalmente establecida a partir del cultivo sucesivo de un sarcoma mielóide de ratones BALB/c (Warner *et al.*, 1969). Estas células expresan marcadores mieloides como CD11b, CD32 (FcγRII), Thy-1, Mac-3, F4/80. Son positivas para esterasa, lisosima y 5'-nucleotidasa pero negativas para peroxidasa y aminopeptidasa (Van Furth *et al.*, 1985). Expresan de manera constitutiva IL-3, cuerpos de Bauer y de manera característica, inducen leucemia cuando son inoculadas en ratones BALB/c (Van Furth *et al.*, 1985). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo IMDM (Iscové's Modified Dulbecco's Medium) (Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, USA) desactivado por calor, L-Glutamina 2 mM y 1.1 uM de β-mercaptoetanol (Sigma Aldrich, USA) a una densidad de 3×10^4 células/mL, 37° C y 5 % de CO₂ con cambio de medio cada 48 h.

Animales

Los procedimientos que involucraron animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ratones hembra BALB/c de dos a tres meses de edad, en condiciones libres de patógenos y alimentados con una dieta estándar de laboratorio, fueron alojados en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza hasta su uso.

Obtención de células mononucleadas de médula ósea de ratón

Para la obtención de células de médula ósea, un ratón hembra de la cepa Balb/c fue sacrificado por dislocación cervical obteniendo ambos fémures. La epífisis fue perforada haciendo fluir PBS (solución estabilizadora de fosfatos) se extrajeron las células totales de médula ósea. Posteriormente se aislaron las células mononucleadas mediante un gradiente de densidad empleando Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich, USA) de una densidad de 1.077 g/ml, posteriormente se lavaron dos veces con solución estabilizadora de fosfatos (PBS) y fueron

contadas en cámara de Neubauer bajo el microscopio a 10x y la viabilidad por la técnica de exclusión al azul tripano (Sigma Aldrich, USA).

Caseinato de sodio (CasNa)

El CasNa (Spectrum, USA) se solubilizó en PBS (solución estabilizadora de fosfatos) y esterilizo por autoclave, preparando una solución patrón de 100 mg/mL, realizando diluciones en PBS para llegar a la concentración de 2mg/mL para estimular a las CMN, WEHI-3 y WEHI-3GFP (Ledesma-Martínez *et al.*, 2012).

Proliferación

Para evaluar la proliferación celular de las células WEHI-3GFP o de células mononucleadas de médula ósea (CMN) se cultivaron durante 72 o 120 h, con o sin CasNa en placas de 96 pozos (Costar, USA); una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugo la placa y las células adheridas se fijaron con glutaraldehido al 1.1% durante 1 hora, después se adicionó la solución de cristal violeta (Sigma, Missouri, USA) para teñir el núcleo celular (Kueng *et al.*, 1989), como método indirecto para cuantificar el número celular (Gillies *et al.*,1986), se retiró el exceso de colorante con agua destilada. En seguida se agregaron 50 µL de ácido acético al 10% a cada pozo, agitándolo durante 20 minutos en un agitador de placas (Red Rotor, Instrumental electrónicas, USA) para solubilizar el colorante. La densidad óptica de las células fue evaluada a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Spectra Tecan Image, Austria).

Viabilidad celular

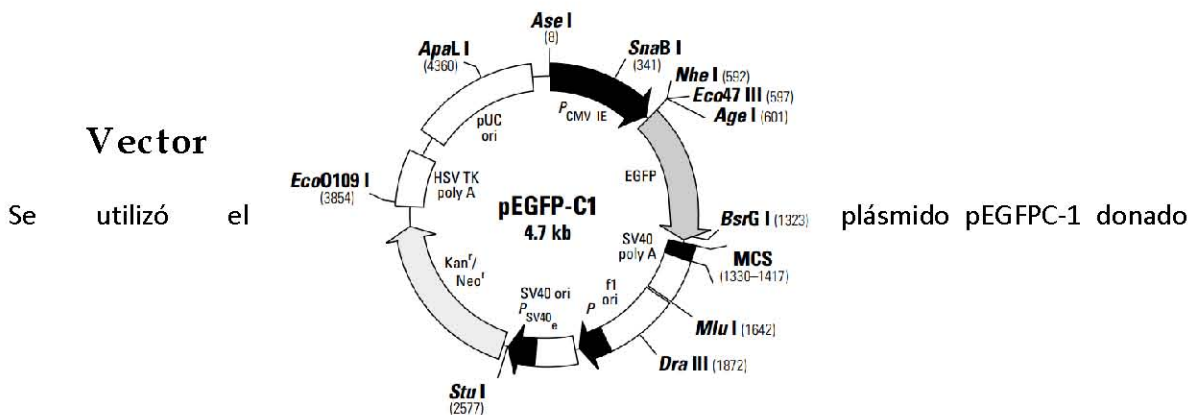
Se evaluó mediante dos formas: A) MTS la cual se fundamenta en la reducción metabólica una sal de tetrazolio, en este caso [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) mediante la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en una sal de formazán de color azul (Borenfreud *et al.*, 1988). Es un ensayo colorimétrico basado en la cuantificación espectrofotométrica en el que el valor de absorbancia obtenido es proporcional al número de células metabólicamente activas (capaces de reducir MTS), permite valorar la viabilidad celular y la actividad mitocondrial de forma directa, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de sal de formazán formada (Castro, 2006).

Brevemente después de 120 h de estímulo sin y con CasNa se adicionaron 20 µL de CellTiter96 (Promega, USA) a la placa y durante 4 h se mantuvo dentro de la incubadora, posteriormente se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Spectra Tecan Image, Austria) a una densidad óptica de 490 nm.

B) Azul tripano, para determinar la presencia de necrosis en las células WEHI-3GFP, después del cultivo se tomó una muestra celular en proporción 1:1 con colorante azul tripano se evaluó por conteo directo en una cámara de Neubauer, expresándose el porcentaje de células vivas (refractantes) en oposición a las células muertas (teñidas de azul) respecto al número celular total.

Establecimiento de cocultivo de células WEHI-3GFP y CMN

Las células WEHI-3GFP+, WEHI-3 parentales no fluorescentes y CMN fueron cultivadas de manera individual y conjunta en placas de 24 pozos a una densidad inicial de 0.75×10^3 y 1×10^5 respectivamente en IMDM suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB) desactivado por calor (Gibco BRL, USA), 5% de suero equino (HyClone, USA). Las células CMN son dependientes de factores de crecimiento exógenos para proliferar y sobrevivir (Goldberg *et al.*, 1981; Francke *et al.*, 2011) por lo tanto, fueron cultivadas como se describe en Ramos-Mandujano *et al.*, 2008 con 5 ng/mL de interleucina 3 recombinante de ratón (rmIL-3) (R&D System, USA), tanto en cocultivo con células WEHI-3 como en los sistemas individuales. En todos los casos se estimularon con 2 mg/mL de CasNa durante un periodo máximo de 120 h, considerando controles de sólo PBS como vehículo; al término del cultivo las células se recuperaron por centrifugación, fueron lavadas en PBS.



por el Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta (Hospital General de México). El plásmido pEGFPC-1, expresa de manera constitutiva GFP bajo el control del promotor de CMV y confiere resistencia frente a neomicina/kanamicina vía la expresión del gen Tn5 regulado por el promotor de SV40 (BD BiosciencesClontech, 2002) (Figura 3).

Figura 3. Mapa del plásmido pEGFPC-1 de 4.7 kb (tomado de BD Biosciences-Clontech, 2002).

Establecimiento de la dosis de selección con el antibiótico G418

Se realizó una curva dosis respuesta de la proliferación y viabilidad de las células leucémicas WEHI-3 determinando la dosis requerida para inducir letalidad (IC_{50} , IC_{25} , IC_{10}) en presencia del antibiótico Geneticina® (G418) (Invitrogen, USA). La línea celular WEHI-3 se sembró en una placa de 96 pozos fondo plano (Corning, USA) a una densidad de 3×10^3 células/mL de medio de cultivo adicionando concentraciones de (0), 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 mg/mL de G418 y se dejó en cultivo a 37°C y 5 % de durante 72 h. Posteriormente se centrifugo la placa y las células adheridas se fijaron con glutaraldehído al 1.1% durante 1 hora, después se adiciono la solución de cristal violeta (Sigma, USA) para teñir el núcleo celular (Kueng *et al.*, 1989), como método indirecto para cuantificar el número celular (Gillies *et al.*, 1986), se retiró el exceso de colorante con agua destilada. En seguida se agregaron 50 μ L de ácido acético al 10% a cada pozo, agitándolo durante 20 minutos en un agitador de placas (Red Rotor, Instrumental electrónicas, USA) para solubilizar el colorante. La densidad óptica de las células fue evaluada a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (SpectraTecanImage, Austria), posteriormente los datos obtenidos fueron graficados en

porcentaje de proliferación. Mediante la ecuación de regresión lineal se determinó las concentraciones necesarias de G418 para inhibir al 50, 75 y 90% la proliferación celular (IC_{50} , IC_{25} , IC_{10}) de WEHI-3.

Transfección de WEHI-3

Para la generación de WEHI-3GFP con la expresión constitutiva estable de la proteína verde fluorescente (GFP). Brevemente, las células WEHI-3 fueron transfectadas con el plásmido pEGFPC-1 utilizando Lipofectamine® LTX & Plus Reagent (Invitrogen, USA). Se sembraron en 4×10^4 células WEHI-3 por mL en una placa de 24 pozos de ultra baja adherencia (Corning, USA) utilizando tres distintos medios de cultivo IMDM (Gibco BRL, USA), DMEM (Gibco BRL, USA) y optiMEM (Gibco BRL, USA), una hora antes de comenzar la transfección. Para la preparación del plásmido se diluyeron 5 μ g del plásmido en 400 μ L de su respectivo medio, una vez hecho esto se mezcló el Plus Reagent (Invitrogen, USA) y se agregó 10 μ L a cada preparación del plásmido, se mezcló e incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se le agregó 2.5 μ L de Lipofectamine® LTX (Invitrogen, USA) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente; después de la incubación se añadió 112.5 μ L del resultante a cada pozo de la placa; en cada condición se agregó 0%, 0.1%, 0.2%, y 0.3% de SFB (dado que WEHI-3 es una línea celular dependiente de SFB). Por último se mezcló suavemente en el agitador de placas durante 30 minutos; las placas se dejaron en la incubadora a 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO_2 por 24 horas, pasado este tiempo se centrifugó la placa y posteriormente un cambio de 500 μ L de medio al 10% de SFB. Al término de la transfección se comenzó la selección de WEHI-3GFP tratándolas con 0.41 mg/mL de Geneticina® (Invitrogen, USA); los clones seleccionados se expandieron en IMDM (Gibco BRL, USA), suplementado con el 10% de SFB (Gibco BRL, USA) desactivado por calor, L-Glutamina 2 mM y 1.1 μ M de β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich, USA), 37°C y 5 % de CO_2 con cambio de medio cada 48 h además de ir incrementando la concentración de Geneticina® (G418) (Invitrogen, USA) a fin de mantener la expresión del gen EGFP

Verificación de positividad para GFP

Para la cuantificación de la expresión de GFP, la intensidad de fluorescencia se midió por citometría de flujo utilizando un BD FACSAria II™ (Becton Dickinson, Alemania) al término de la transfección, las células se lavaron con 2 mL de PBS y se resuspendieron en FACSFlow™ (Becton Dickinson, USA) para el análisis FACS, adquiriendo 10,000 eventos por muestra.

Además de lo anterior la positividad de GFP se visualizó en el microscopio de fluorescencia, se tomaron 200 µL de cada muestra para con ello realizar un citospin en una citocentrífuga (Shandon Southern, USA); las muestras fueron observadas en un microscopio con focal Axio Vert.A1 (Zeiss, Alemania) en campo claro y posteriormente en campo oscuro a 10x.

Análisis de fragmentación del ADN

Se empleó la detección de degradación en ADN como criterio de muerte celular por apoptosis. Brevemente, es conocido que durante el proceso de muerte celular por apoptosis se presenta la síntesis de endonucleasas que cortan el ADN a nivel internucleosomal, liberando nucleosomas los cuales se sabe que contienen alrededor de 200 pares de bases. Al realizar un corrimiento electroforético de las muestras resultantes de una extracción de ADN de células apoptóticas es posible observar la aparición de un patrón característico de ADN en escalera, mejor conocido como “DNA Ladder” (Alfaro *et al.*, 2000); al realizar este procedimiento se verificó la integridad del ADN de cultivos de WEHI-3 y CMN individuales y conjuntos sin y con CasNa.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de 120 h WEHI-3GFP, CMN y el cocultivo de ambas estimuladas con PBS o 2 mg/mL de CasNa, las muestras se colocaron en eppendorf con 1mL de PBS y centrifugaron (Hermle Z300K) a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos a 17 C. Se retiró todo el PBS y se adicionaron 500 µL de DNAzol (Invitrogen, USA), se resuspendió lenta y suavemente hasta disolver el botón celular e inmediatamente se incubó durante 20 minutos a 4°C, una vez transcurrido este tiempo se adicionó 1mL de etanol absoluto (Sigma, USA) se mezcló por inversión 6 veces. Hecho lo anterior se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrifuga (Hermle Z300K) realizada la centrifugación se decantó el sobrenadante y se realizó la misma operación utilizando etanol al 75% (Sigma, USA). Posteriormente se dejó secar los restos de etanol por 3 minutos a temperatura ambiente y finalmente se hidrató agregando de 20 a 40 µL de agua libre de RNAsas (DEPC, dietilpirocarbonato) proporcionalmente al tamaño del botón de cada muestra.

Finalmente, el corrimiento de las muestras se llevo a cabo en un gel de agarosa al 1.5% Ultrapure™ Agarose (Invitrogen, USA) en buffer triacidoborico-EDTA 1x (TBE), adicionado con 30µL del stock (0.5µg/mL) de bromuro de etidio (Sigma, USA) se cargaron 4 µL de marcador de peso moleculares O' GeneRuler 1kb Plus ADN (Genetimes Technology, Hong Kong), 4µL del buffer de carga (Promega, USA) y 12 µg de ADN de cada muestra. El gel se corrió a 90 volts durante 1.5 horas, hecho esto el gel se revelo en un transiluminador DigiDoc-it (UVP, USA) y se tomó la fotografía con el programa Doc-It-LS Acquisition Software (UVP, USA).

RESULTADOS

CasNa inhibe la proliferación de WEHI-3, pero potencia la proliferación de CMN y CC, manteniendo la actividad metabólica

Para confirmar que el CasNa tiene un efecto diferencial sobre la proliferación de la línea de leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3 y células hematopoyéticas normales de médula ósea, tanto en cultivos individuales como en cocultivo, se mantuvieron estas células por 120 h con y sin 2 mg/mL de CasNa después de lo cual, evaluamos tanto la proliferación por cristal violeta, como la actividad metabólica por reducción de MTS, como criterio de viabilidad celular. Se demostró que CasNa inhibe la proliferación de WEHI-3 tras 120 horas de cultivo con respecto al vehículo, pero en el mismo tiempo estimula la proliferación de CMN y el cocultivo de ambas (Figura 4). Por otra parte, el CasNa redujo la actividad metabólica en el cultivo individual de WEHI-3, pero no en CMN ni CC. Por el contrario, aumentó en CMN y CC, aunque el CC fue significativamente menor que en CMN en presencia de CasNa, lo cual indica una reducción de la viabilidad (Figura 5).

Una vez que confirmamos la actividad diferencial por efecto de CasNa, nos preguntamos quiénes eran las células que no proliferaban y las responsables de la reducción de la viabilidad dentro del CC, por ello se decidió transfectar las células WEHI-3 con un vector de expresión constitutiva para el gen reportero de la proteína fluorescente (GFP), de esta manera podríamos detectar a las células WEHI-3 en un CC con CMN.

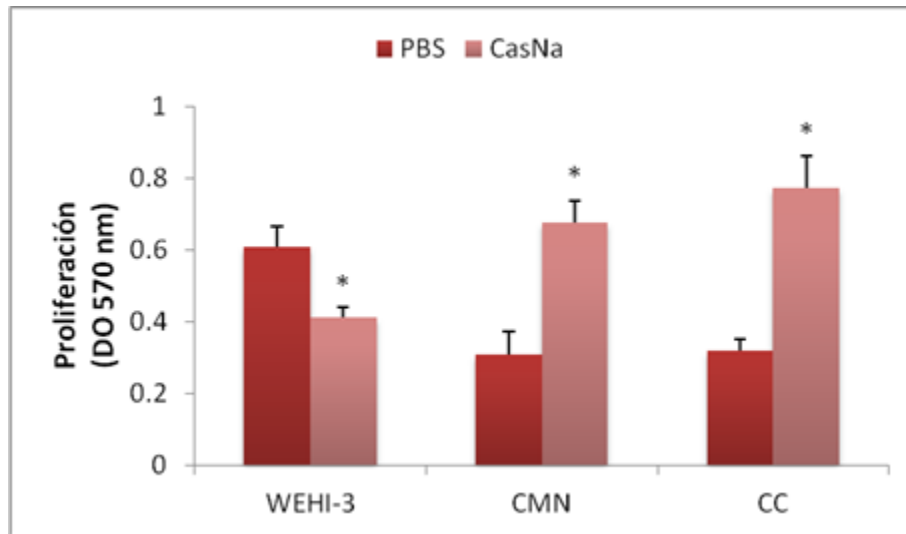


Figura 4. Porcentaje de proliferación de la línea celular leucémica mielomonocítica (WEHI-3), células hematopoyéticas normales de médula ósea (CMN) y el cocultivo de ambas (CC) en ausencia o presencia de 2mg/mL de CasNa después de 120 h de cultivo. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de 3 ensayos independientes. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto a solución buffer de fosfatos (PBS) en el ANOVA Tukey.

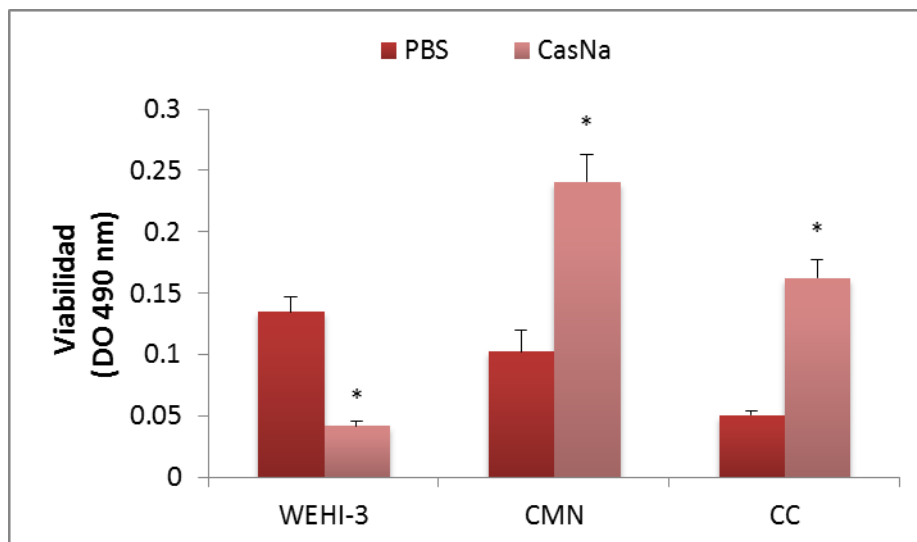


Figura 5. Actividad metabólica (viabilidad) de la línea celular leucémica mielomonocítica (WEHI-3), células hematopoyéticas normales de médula ósea (CMN) y el cocultivo de ambas (CC) en ausencia o presencia de 2mg/mL de CasNa después de 120 h de cultivo. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de 3 ensayos independientes. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto a PBS en el ANOVA Tukey.

El antibiótico G418 inhibe la proliferación de las células leucémicas WEHI-3 de manera dosis dependiente, con una IC_{50} de 0.41mg/mL

El vector pEGFPC-1 además de expresar de manera constitutiva la proteína verde fluorescente, confiere resistencia al antibiótico Geneticina. Por lo tanto, nos preguntamos si las células WEHI-3 paténtales son sensibles a la presencia de este antibiótico, de ser así, únicamente las células portadoras del vector serían capaces de sobrevivir y proliferar en presencia de antibiótico G418, análogo a Geneticina. De esta manera podríamos seleccionar fácilmente aquellos cultivos de células WEHI-3 portadores del vector, de aquellos cultivos no portadores del vector y en consecuencia negativos para la expresión de GFP.

Luego de estimular a las células WEHI-3 con diferentes concentraciones de G418, se encontró que este antibiótico inhibe la proliferación de la línea celular WEHI-3 en forma dependiente de la concentración en evaluaciones a 72 h (Figura 6). Una vez obtenida la curva de proliferación se calcularon las concentraciones necesarias para inhibir al 50, 75 y 90% la proliferación celular (IC_{50} , IC_{25} , IC_{10}) mediante un análisis de regresión lineal (Tabla 3).

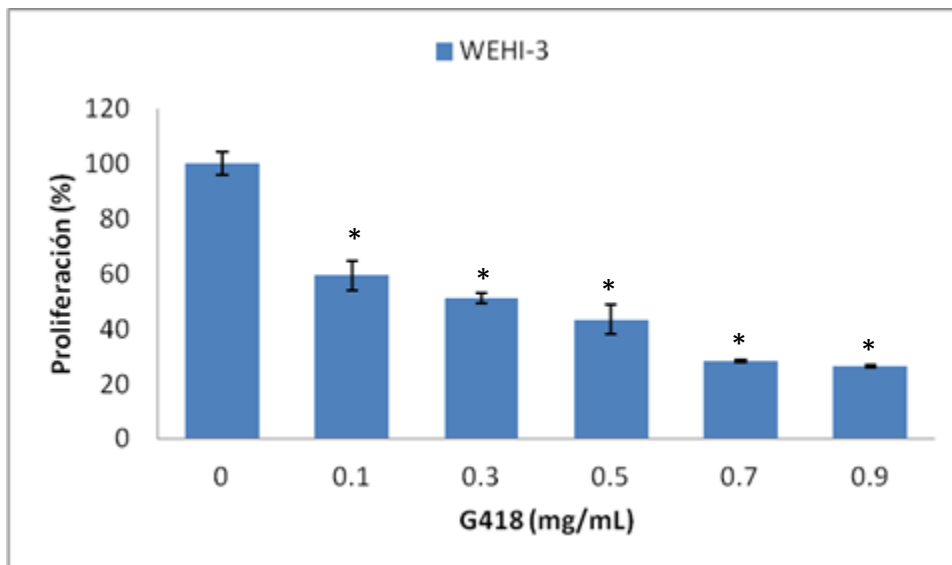


Figura 6. Efecto antiproliferativo inducido por Geneticina® (G418), sobre la línea celular leucémica mielomonocítica WEHI-3. Evaluación mediante la técnica de cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control (0), 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 y 0.9 mg/mL. Valores promedio de tres ensayos independientes con tres repeticiones. *Significancia estadística contra su respectivo control ANOVA Tukey $p < 0.05$.

Células	Geneticina® (G418)		
WEHI-3	IC ₅₀ 0.41 mg/mL	IC ₂₅ 0.84 mg/mL	IC ₁₀ 1.10 mg/mL

Tabla 3. Valores de IC₅₀, IC₂₅, IC₁₀ (mg/mL) para la línea celular leucémica mielomonocítica WEHI-3. Calculada con base en la curva dosis-respuesta y obtenida a partir de una ecuación de regresión lineal.

Transfección con el vector pEGFP-C1 y seguimiento de las células leucémicas WEHI-3 transfectadas

Una vez conocida la concentración de Geneticina (G418), con la cual posteriormente se seleccionaría a las células portadoras del vector, se procedió a realizar la transfección de la línea celular leucémica WEHI-3 con el plásmido pEGFP-C1, bajo diferentes condiciones de medio de cultivo y SFB, dado que no se tenían las condiciones óptimas para obtener mayor porcentaje de expresión de GFP utilizando Lipofectamine LTX & Plus Reagent. Después de 72 horas de la transfección se analizaron las muestras mediante citometría de flujo, para conocer la eficiencia de la transfección por medio del porcentaje de positividad para GFP, adquiriendo 3,500 eventos por muestra. En donde se obtuvo que ninguna combinación de optiMEM y SFB rindió más de 0.9% de células WEHI-3 positivas para GFP (Figura 7), por su parte la combinación de DMEM y 0.1% de SFB rindió un máximo de 6.4% de células WEHI-3 positivas para GFP (Figura 8); mientras que los mayores porcentajes de eficiencia, fueron logrados en combinación con IMDM, en donde IMDM 0.2% SFB generó **5.6% GFP+**; IMDM 0.1% SFB= **10.1% GFP+**; IMDM 0% SFB= **32.9% GFP+** (Figura 9). Dentro de todas las combinaciones las condiciones marcadas como control contenían Lipofectamine® LTX & Plus Reagent pero no el plásmido, así como 10% de SFB, es decir eran el control de fluorescencia basal o autofluorescencia de la población.

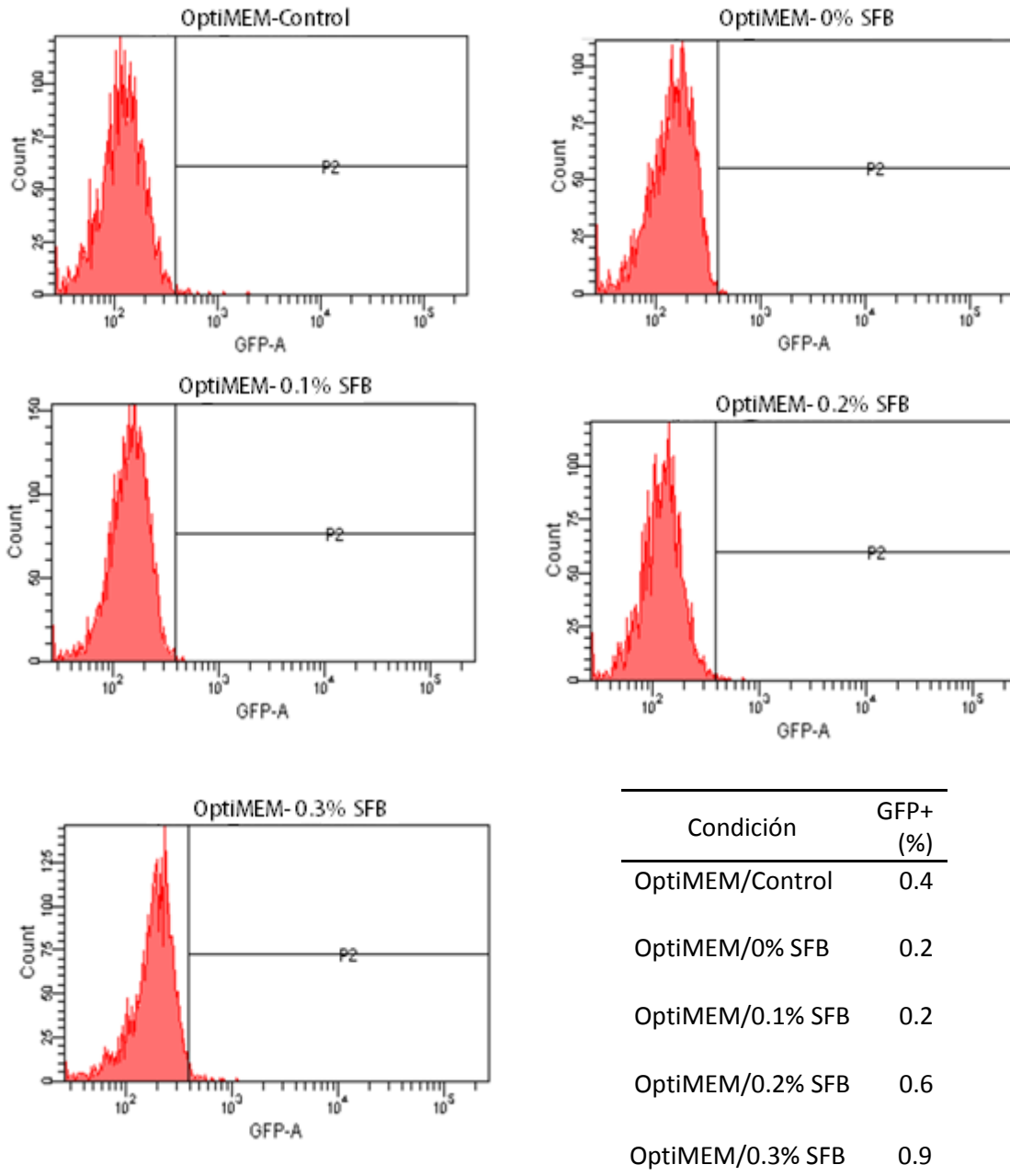


Figura 7. Ninguna combinación de optiMEM y SFB rinde más de 0.9% de células WEHI-3 positivas para GFP. Verificación de la positividad de las células WEHI-3 72 horas después de la transfección con el plásmido pEGFPC-1; en donde OptiMEM-control son células WEHI-3 en medio de cultivo OptiMEM al 10 % SFB sin ningún plásmido como control de la población.

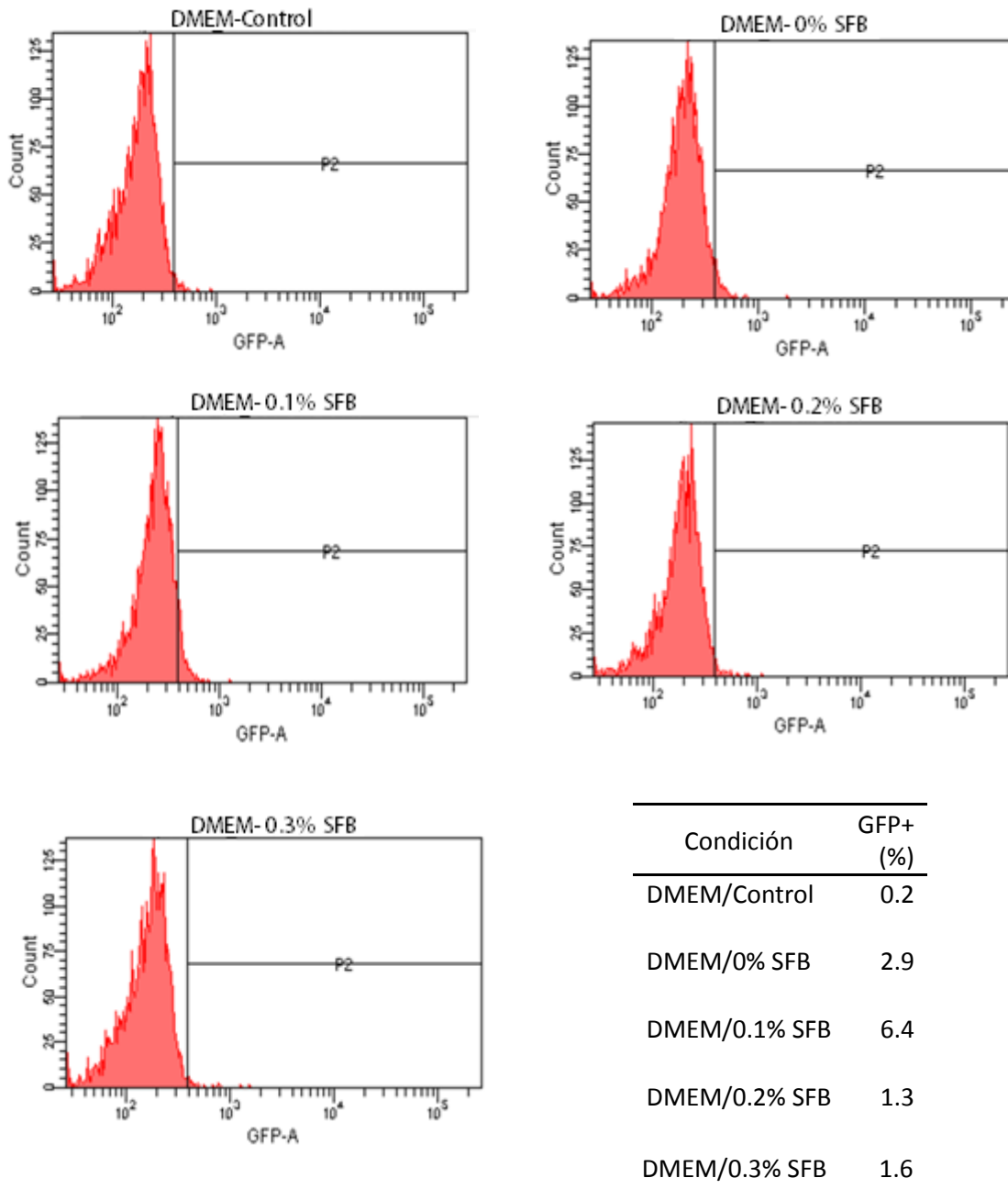


Figura 8. La combinación de DMEM y 0.1% de SFB rinde un máximo de 6.4% de células WEHI-3 positivas para GFP. Verificación de la positividad de las células WEHI-3 72 horas después de la transfección con el plásmido pEGFPC-1; en donde DMEM-control son células WEHI-3 en medio de cultivo DMEM al 10 % SFB sin ningún plásmido como control de la población.

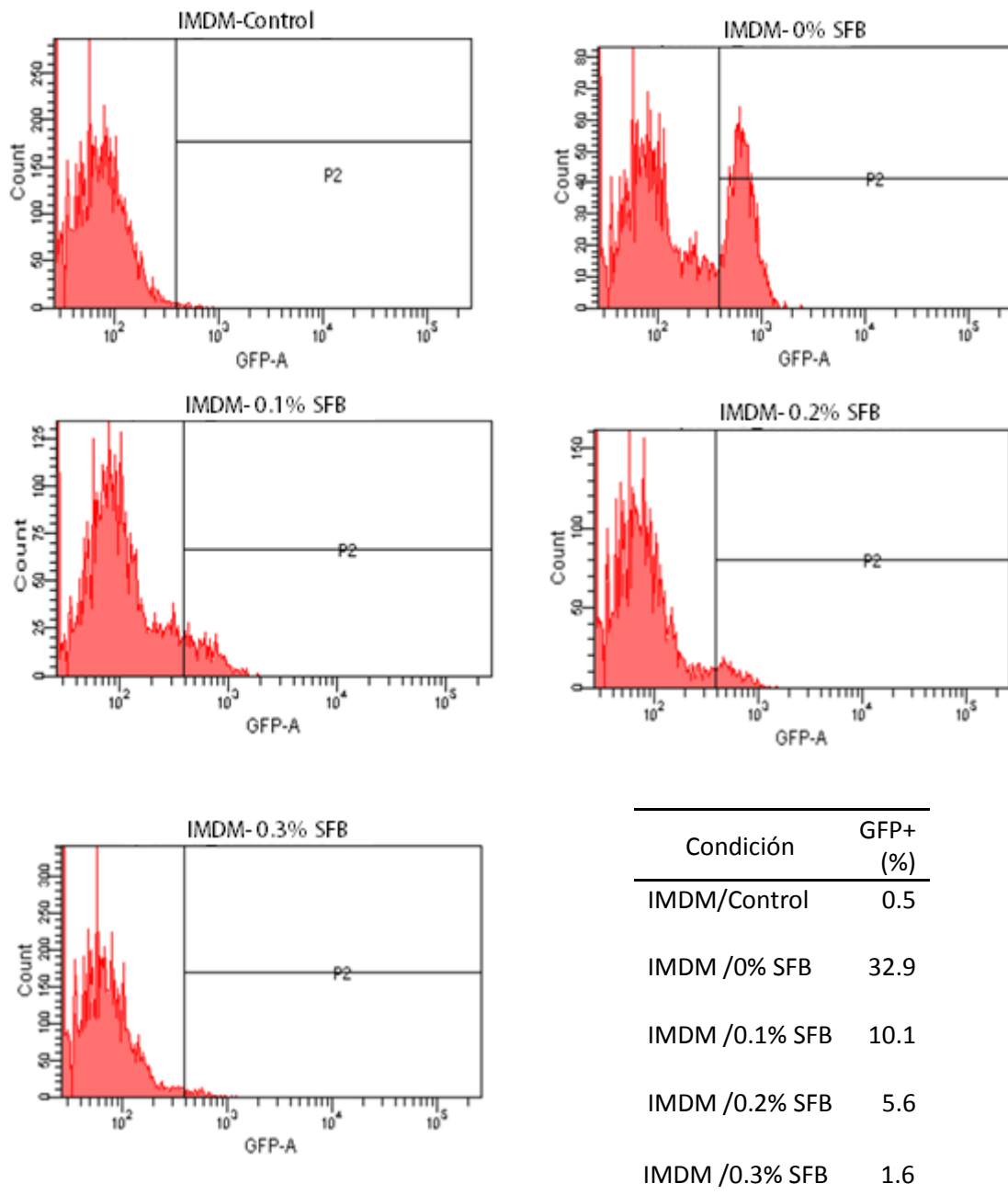


Figura 9. La combinación de IMDM y la ausencia de SFB rinde un máximo de 32.9% de células WEHI-3 positivas para GFP. Verificación de la positividad de las células WEHI-3 72 horas después de la transfección con el plásmido pEGFPC-1; en donde IMDM-control son células WEHI-3 en medio de cultivo IMDM al 10 % SFB sin ningún plásmido como control de la población.

Después de la obtención de condiciones de un 32.9% de células WEHI-3GFP+ se comenzó la selección de las células WEHI-3GFP tratándolas con la IC_{50} de Geneticina (G418) 0.41 mg/mL. Las WEHI-3GFP se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar a una densidad de $1 \times 10^2 - 3 \times 10^4$ células/mL con cambio de medio cada 48 h; luego de dos semanas en cultivo se incrementó gradualmente la concentración de Geneticina (G418) de 0.41 a 0.84 mg/mL, siendo la expresión para GFP monitoreada regularmente, así luego de 6 semanas post-transfección la positividad se incrementó hasta el 99% (Figura 10a). Adicionalmente a la determinación por citometría de flujo de la expresión de GFP, se visualizó un citocentrifugado de WEHI-3GFP a 10x (Figura 11) bajo una luz de 470 nm aproximadamente, y se comprobó que aun utilizando una herramienta de menor sensibilidad como lo es la microscopia de fluorescencia se puede confirmar que estas células son verde fluorescente (GFP+).

Así mismo durante 9 semanas más la positividad de WEHI-3GFP se mantuvo por encima del 90% (Figura 10b); sin embargo, se observó que cultivos en ausencia de G418 es decir, sin la presión de selección por parte del antibiótico, la expresión de GFP en las células WEHI-3GFP es casi nula (Figura 12).

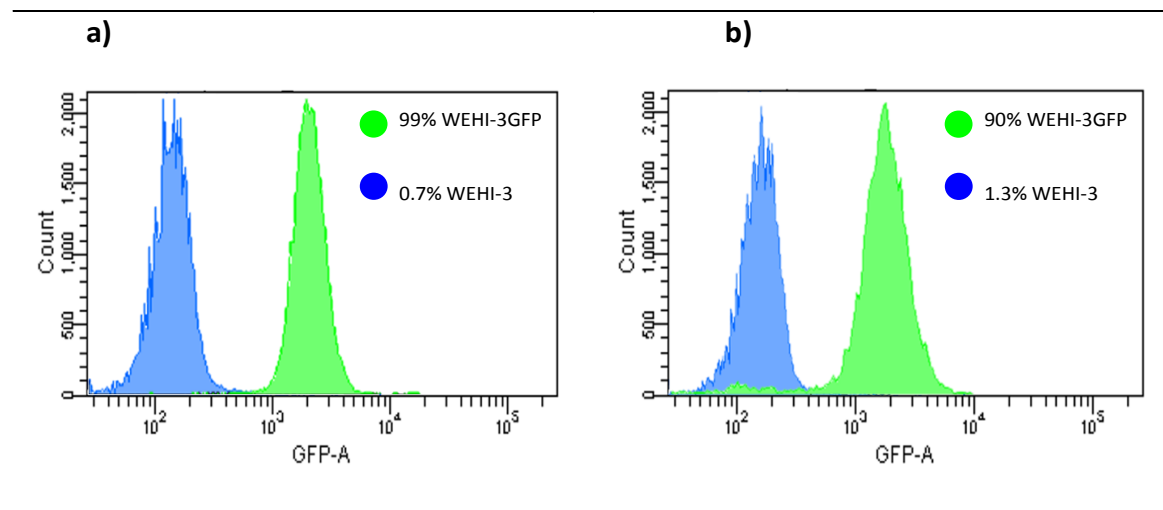


Figura 10. Expresión de GFP en las células WEHI-3GFP generadas con el plásmido pEGFPC-1 a) seis semanas después de la transfección y b) quince semanas post-transfección. Se muestra de color azul WEHI-3 como control de fluorescencia basal y de color verde la fluorescencia de las células WEHI-3GF.

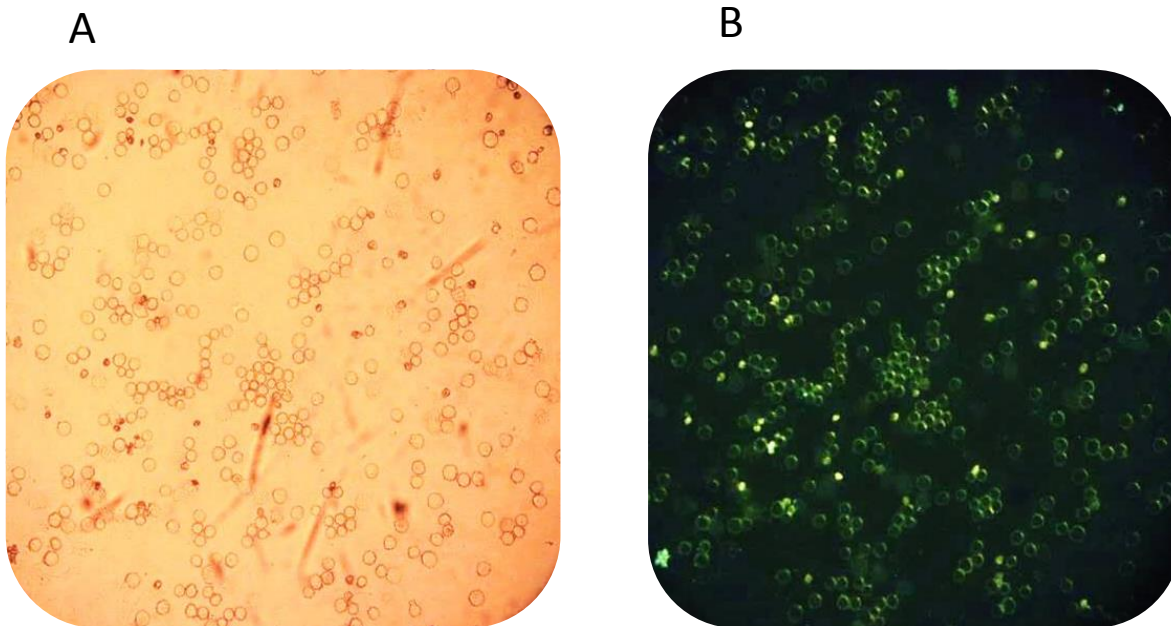


Figura 11. Expresión de GFP en las células WEHI-3GFP generadas con el plásmido pEGFPC-1 detectada mediante microscopia de fluorescencia. WEHI-3 transfectadas con el plásmido pEGFPC-1 observadas (A) microscopia de campo claro y (B) microscopia de fluorescencia. Se observan las células WEHI-3GFP sometidas a luz LED (300 a 470 nm). Imagen representativa a 10X.

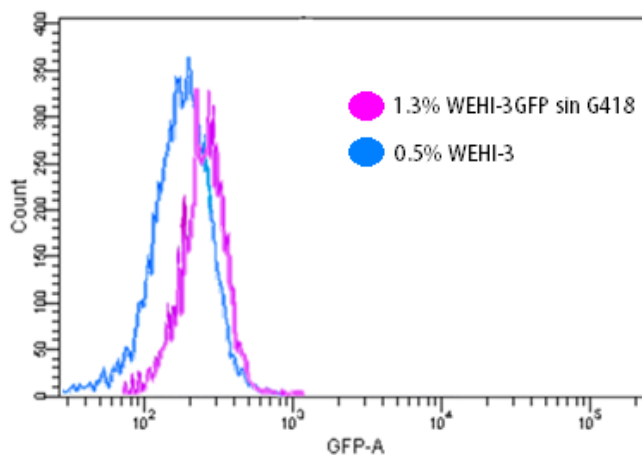


Figura 12. La expresión de GFP en las células WEHI-3GFP generadas con el plásmido pEGFPC-1 es dependiente de la presencia de G418. Se muestra de color azul WEHI-3 como control de fluorescencia basal y de color rosa las células WEHI-3GFP sin la presión de selección del antibiótico (G418).

Las células WEHI-3GFP son morfológicamente similares y responden a la presencia de CasNa de manera similar que las células WEHI-3, en evaluaciones de proliferación a 72h de cultivo

Los resultados anteriores muestran que las células transfectadas expresaban GFP y que ésta era dependiente de la presión de selección con el antibiótico G418. Es conocido que la expresión de una proteína heteróloga como GFP, es inocua para la célula portadora del transgen sin embargo, desconocíamos si bajo nuestras condiciones de cultivo, las células WEHI-3 positivas para GFP eran similares en morfología y proliferación a la línea celular leucémica parental sin transfección y si en presencia de 2 mg/mL de CasNa también se inhibiría su proliferación celular.

Por lo anterior, se compararon WEHI-3 y WEHI-3GFP tanto en morfología como en cultivo celular y la Figura 13A y Figura 13C muestra que las células WEHI-3GFP forman agregados celulares en suspensión al igual que su contraparte WEHI-3; por otro lado al observar las imágenes 13B y 13D los citocentrifugados de ambas muestran características que las hacen morfológicamente similares.

De manera interesante, se encontró una diferencia significativa en la proliferación de las células transfectadas (WEHI-3GFP) comparada con la línea parental (WEHI-3) en presencia de PBS como vehículo; sin embargo se demostró que tanto WEHI-3 como WEHI-3GFP inhiben su proliferación de manera similar en presencia de 2 mg/mL de CasNa después de 72 h de cultivo (Figura 14) y en ambas se ve afectada la viabilidad celular en 5% y 3% respectivamente, por lo que WEHI-3GFP se comporta igual que la línea parental en presencia de CasNa (Figura 15).

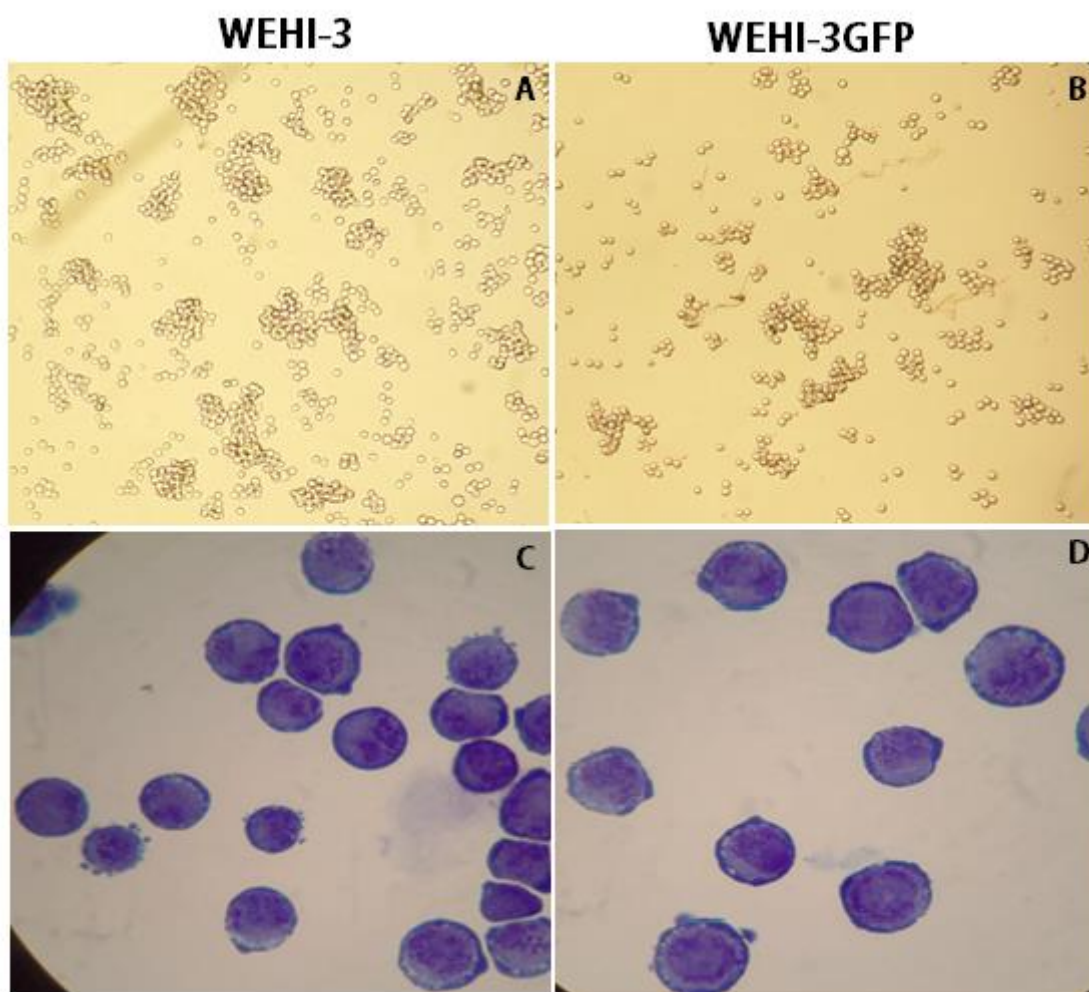


Figura 13. Comparación entre las células WEHI-3 y las transfectadas WEHI-3GFP cultivos de WEHI-3 (A) y WEHI-3GFP (C) observada en el microscopio (10x) después de 48 horas de cultivo al 10% de SFB y 1.1 μ M de β -mercaptoetanol en ambos casos. Cito centrifugados de WEHI-3 (C) y WEHI-3GFP (D) observada en el microscopio (100x) después de 48 horas de cultivo.

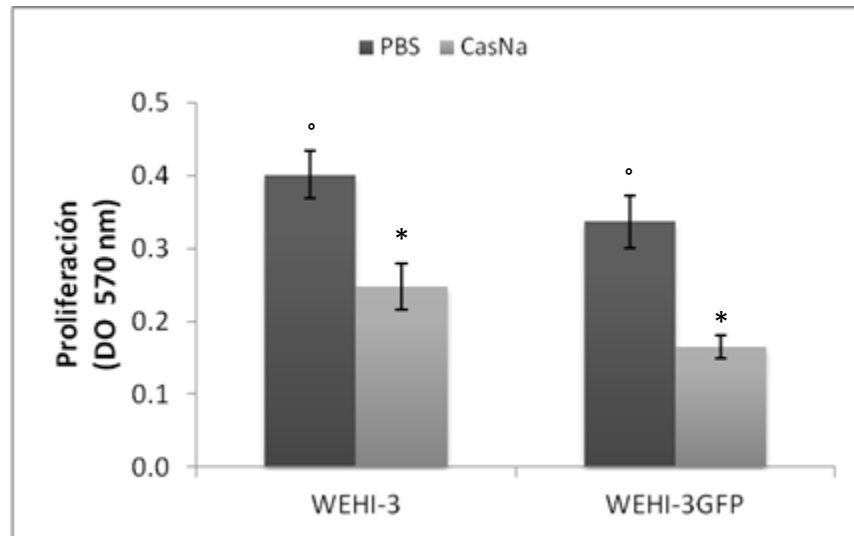


Figura 14. CasNa inhibe la proliferación de WEHI-3 como de WEHI-3GFP. Evaluación de proliferación de las células WEHI-3 y WEHI-3GFP en ausencia o presencia de 2mg/mL de CasNa tras 72h de cultivo, por cristal violeta. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de 3 ensayos independientes. Significancia estadística *^o p<0.05 respecto al control (0mg/mL) en el ANOVA Tukey.

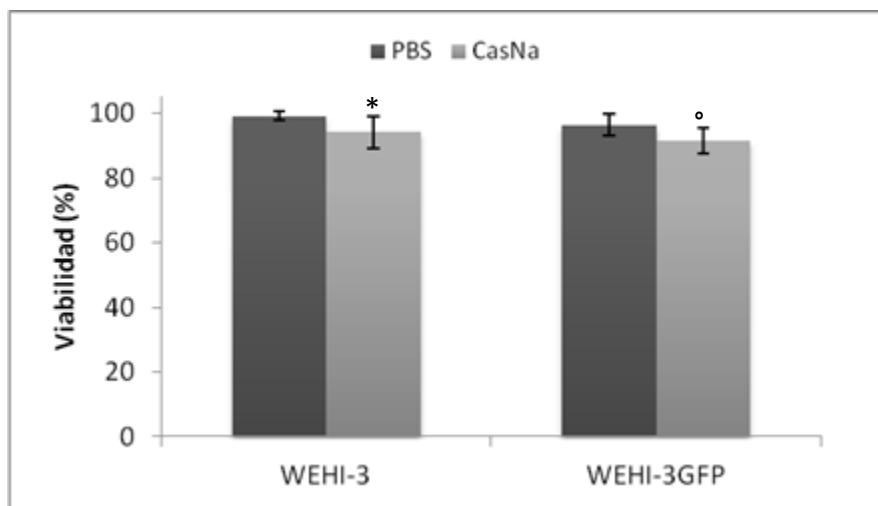


Figura 15. CasNa disminuye la viabilidad de WEHI-3 y WEHI-3GFP a 72 de cultivo. Evaluación de viabilidad de las células WEHI-3 y WEHI-3GFP en ausencia o presencia de 2mg/mL de CasNa tras 72h de cultivo mediante exclusión al azul tripano. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de 3 ensayos independiente. Significancia estadística *^o p<0.05 respecto al control (0mg/mL) en el ANOVA Tukey.

El CasNa inhibe la proliferación de las células leucémicas WEHI-3GFP pero potencia la de las células mononucleadas de médula ósea normal y del cocultivo de ambas

Establecimos que las células WEHI-3 transfectadas (WEHI-3GFP) eran similares en proliferación, viabilidad y morfología a las células parentales WEHI-3 y que ambas inhibían su proliferación en presencia de CasNa. Por lo anterior, realizamos un cocultivo como en la Figura 4 pero con células WEHI-3GFP para evaluar el porcentaje de células positivas para GFP en presencia y ausencia de 2mg/mL de CasNa, considerando controles de células WEHI-3 y CMN tanto en forma individual como en CC.

Por lo que se realizó un cocultivo con las condiciones anteriormente mencionadas y tras 120 h de cultivo se observó bajo el microscopio que el CasNa disminuyó la proliferación de WEHI-3GFP con respecto al vehículo, sin embargo se puede apreciar un aumento la proliferación tanto en el cultivo de CMN como en CCGFP comparados contra sus respectivos vehículos (Figura 16) tal como habíamos observado en los ensayos iniciales con células WEHI-3 parentales (Figura 4).

Cuando evaluamos por citometría de flujo el porcentaje de células verde fluorescentes encontramos que las células WEHI-3GFP estimuladas con PBS, tienen un 74.3% de células GFP+ mientras que estimuladas con 2mg/mL de CasNa solo se encontró un 30.03% de células GFP+, lo que se traduce en una reducción del 44.27%. De manera inesperada, cuando se evaluó el porcentaje de células verde fluorescentes en los cultivos sin transfección de WEHI-3 y CMN en presencia de CasNa, encontramos un incremento en el porcentaje de fluorescencia (Figura 17), mientras que en el CCGFP tratado con CasNa se encontró una reducción significativa de la positividad a GFP del 50% (pasando de 57.86% en CCGFP/PBS a 28.96% en CCGFP/CasNa) (Figura 17 y Figura 18). Estos resultados son una prueba contundente de que el CasNa reduce el número de células leucémicas en un cocultivo con células normales.

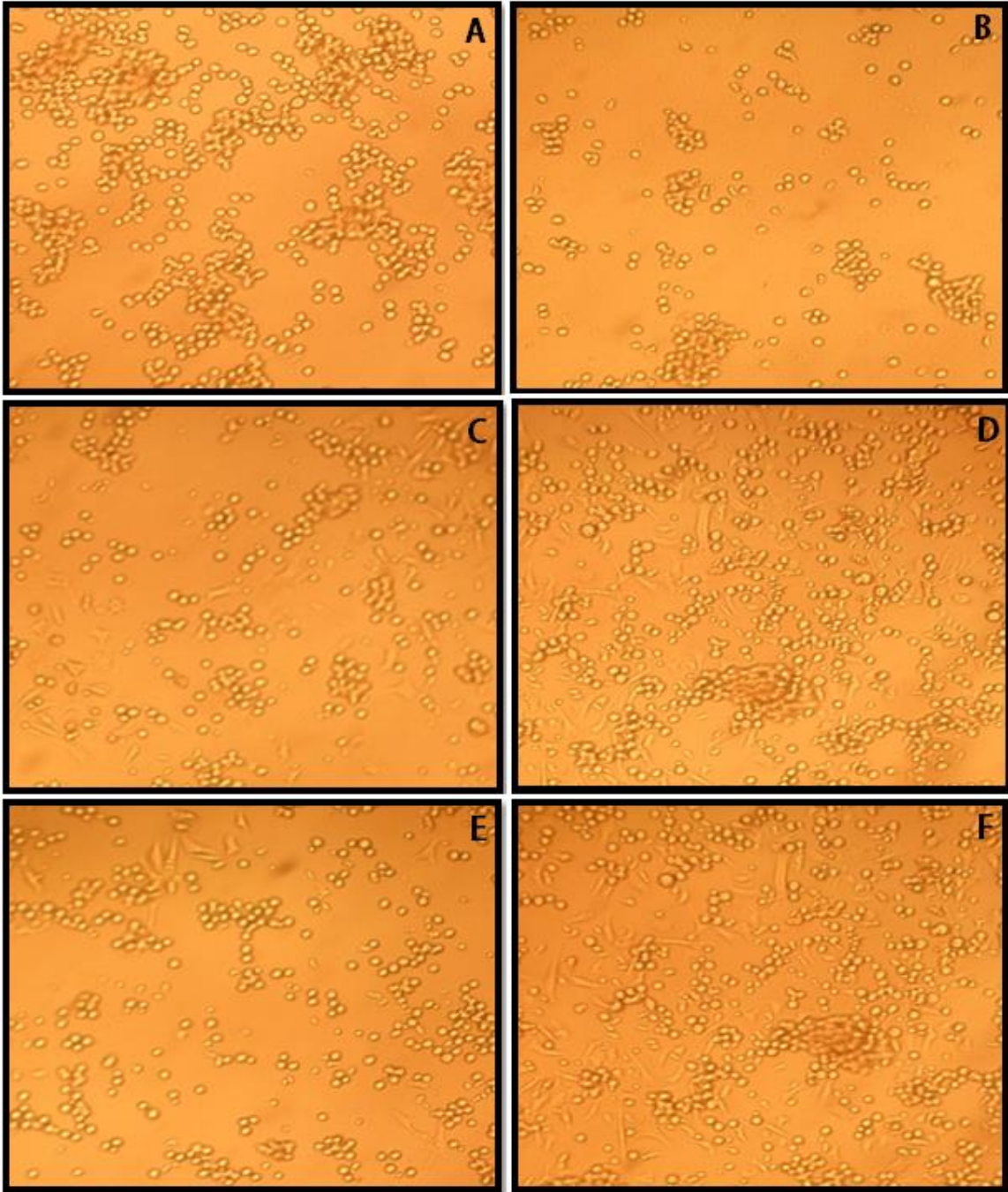


Figura 16. Cultivos de las células WEHI-3GFP, células hematopoyéticas normales de médula ósea (CMN) y cocultivo de ambas (CCGFP) a las 120 horas de estímulo CasNa (2mg/mL) o PBS como vehículo; **A:** WEHI-3GFP+PBS, **B:** WEHI-3GFP+CasNa, **C:** CMN+PBS, **D:** CMN+CasNa, **E:** CCGFP+PBS, **F:** CCGFP+CasNa. Imágenes representativas a 10x.

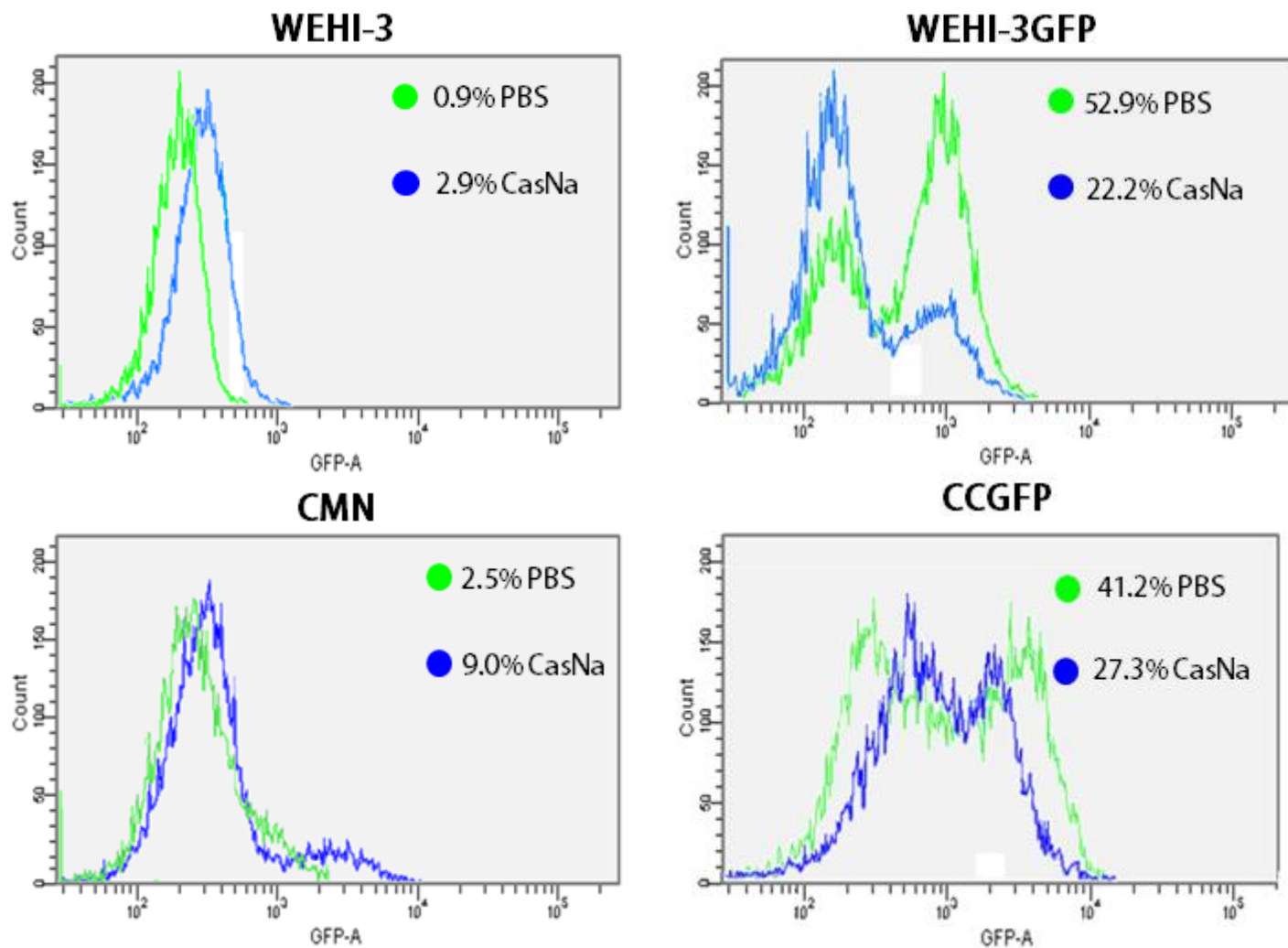


Figura 17. Porcentaje de fluorescencia (GFP) en células WEHI-3GFP, CMN y el cocultivo de ambas (CCGFP) en ausencia o presencia de CasNa (PBS o CasNa respectivamente) a 120 h de cultivo. Histogramas representativos de un solo experimento.

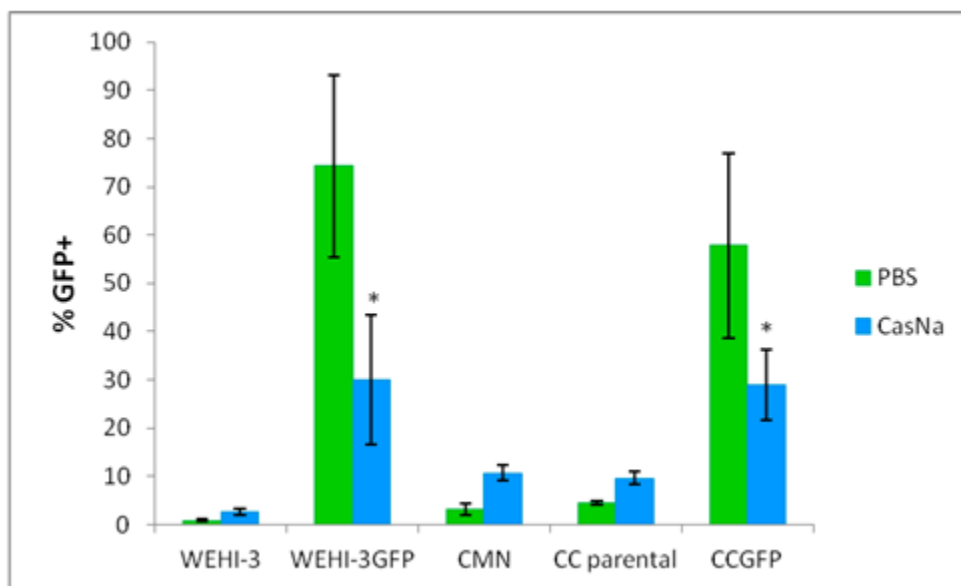


Figura 18. Porcentaje de fluorescencia en células WEHI-3, WEHI-3GFP, CMN, cocultivo parental (CC) y el cocultivo de células mononucleadas y WEHI-3 GFP (CCGFP) en ausencia o presencia de 2 mg/mL de CasNa después de 120 h de cultivo. Valores promedio de tres ensayos independientes. *Significancia estadística $p < 0.05$ respecto a PBS en el ANOVA Tukey.

El CasNa induce fragmentación del ADN en las células leucémicas WEHI-3GFP y cocultivo pero no en mononucleadas de médula ósea normal

Los resultados anteriores muestran una reducción en el número de células positivas a GFP, por lo que existía la posibilidad de inducción de muerte celular, para verificarlo se evaluó la integridad del material genético de células WEHI-3GFP, células mononucleadas de médula ósea y el cocultivo de ambas en ausencia o presencia de 2 mg/mL de CasNa en un corrimiento electroforético. Los resultados mostraron un patrón de ADN en forma de “escalera” característico de células apoptóticas en WEHI-3GFP y CCGFP pero no en CMN tratadas con 2mg/mL de CasNa, mientras que en las condiciones estimuladas con PBS como vehículo este patrón en forma de escalera no se observa, lo cual indica que en estas condiciones no hay muerte celular (Figura 19).

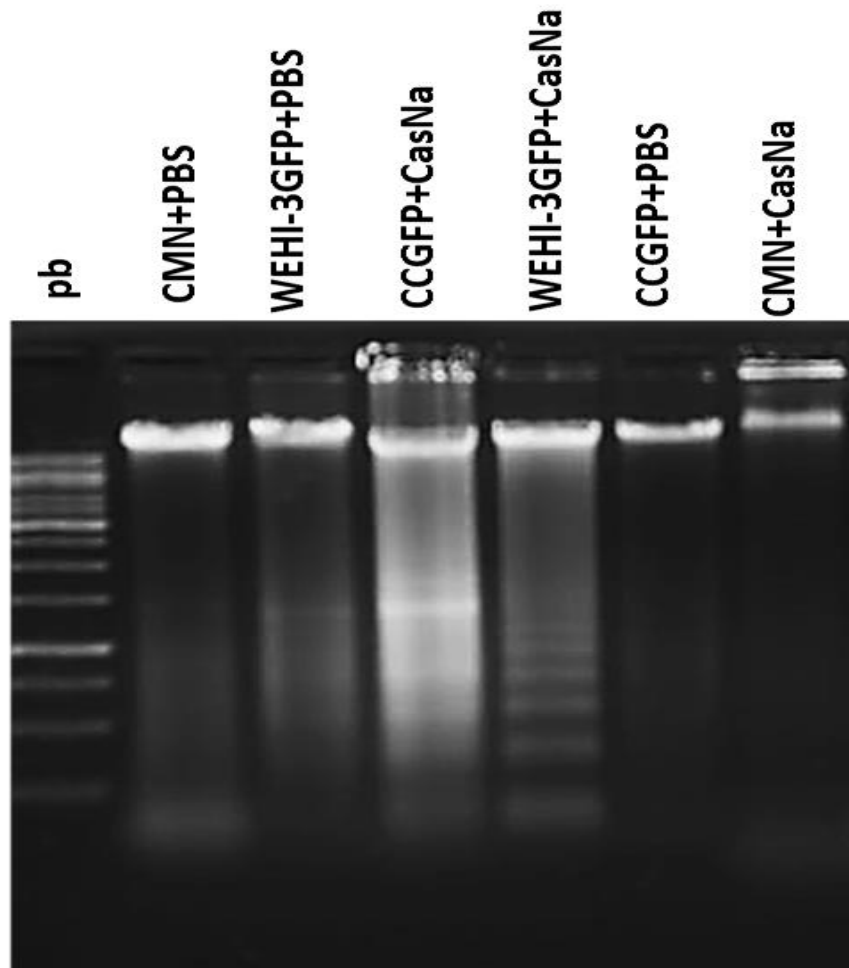


Figura 19. Corrimiento electroforético de ADN de células WEHI-3GFP, CMN y cocultivo de ambas (CCGFP) en ausencia o presencia de 2 mg/mL de CasNa; (pb) marcador de peso molecular.

DISCUSIÓN

La leucemia mieloide aguda (AML) es un desorden agresivo caracterizado por la acumulación de células hematopoyéticas inmaduras en la médula ósea (Jaso *et al.*, 2014; Stone *et al.*, 2004); estas células presentan características distintivas tales como: inestabilidad genómica, sostenida señalización proliferativa, evasión de supresores de diferenciación, resistencia a muerte, inducción de angiogénesis y activación de metástasis (Kushlinskii & Nemtsova, 2014; Hanahan & Weinberg, 2011). A pesar del avance en el conocimiento de las bases celulares y moleculares de esta enfermedad, aún se encuentra dentro de los primeros cinco tipos de cáncer más frecuente y de alta mortalidad a nivel mundial (Tima *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2014; Ferrara & Schiffer, 2013). Tratamientos como la quimioterapia son tóxicos en las células malignas pero también en las células normales, incluyendo las hematopoyéticas lo que compromete la vida del paciente (Shipley & Butera 2009); por lo que, es innegable la necesidad de desarrollar un agente antineoplásico con actividad hacia células malignas, pero carente de toxicidad para los tejidos normales (Hsiao *et al.*, 2014; Lickliter *et al.*, 2003).

Nuestro grupo de trabajo había mostrado que el caseinato de sodio (CasNa) inducía un efecto diferencial sobre la proliferación de células leucémicas y hematopoyéticas normales en cultivos separados (Ledema-Martínez *et al.*, 2012; Ramos-Mandujano *et al.*, 2008) pero desconocíamos si en un cocultivo (CC) el CasNa podía inhibir la proliferación de células leucémicas WEHI-3 pero no de mononucleadas normales y en el mejor de los casos inducir la proliferación de las células sanas, lo que nos acercaría un paso más al antineoplásico ideal.

Las células leucémicas comparten muchas características morfológicas con las células hematopoyéticas sanas sin embargo, solo un patólogo experto puede identificar la presencia de blastos en extendidos de médula ósea, lo cual ha sido por décadas la base del diagnóstico de AML en humanos (NCI, 2009; Robak *et al.*, 2009; Vardiman, 2009). Con el advenimiento de la citometría de flujo, la tipificación de la leucemia por inmunofenotipo ha permitido modernizar el diagnóstico e incluso, hacer predicciones y modificaciones al esquema de tratamiento (Jaso *et al.*, 2014; Weng *et al.*, 2013), sin embargo, cuando las células carecen de un inmunofenotipo específico o de alteraciones cromosómicas que permitan su identificación, es necesaria otra manera de identificación, por lo que la transfección con un gen reportero es la mejor alternativa para rastrear y cuantificar su presencia dentro de un sistema cerrado como es el cultivo celular (Bakhshandeh *et*

al., 2012). Es por ello que en este trabajo, nos planteamos desarrollar una estrategia de identificación de células leucémicas WEHI-3 en cocultivo con células mononucleadas normales de médula ósea (CMN) para analizar si el CasNa, conservaba el efecto diferencial es decir, inhibir la proliferación de las células leucémicas WEHI-3 sin dañar a las células normales.

Dentro de la transferencia génica en células de mamíferos existen dos tipos de vectores (Armenta *et al.*, 2006). Los vectores virales ofrecen una forma atractiva de introducir ADN en las células huésped con alta eficiencia, debido a sus capacidades de transferencia de genes y expresión génica (Legorreta *et al.*, 2012; Bergen *et al.*, 2011); sin embargo también presentan desventajas entre las cuales destacan el alto riesgo de mutagénesis por inserción inespecífica, alta inmunogenicidad y citotoxicidad (Asgharian *et al.*, 2014; Legorreta *et al.*, 2012; Bergen *et al.*, 2011). Por otro lado, en general los vectores no virales rinden una menor eficiencia de transfección comparados con los vectores virales (Akita *et al.*, 2011; Tros de Iarduya *et al.*, 2010). Sin embargo dentro de este panorama los liposomas tienen varias características que los hacen ser atractivos como vectores para la transferencia de genes: no son inmunogénicos, no son tóxicos, pueden entregar múltiples genes de cualquier tipo de ácido nucleico (lineal o súper enrollado), los liposomas como transportadores de ADN pueden transfectar células que no se dividen (incluyendo neuronas), mayor eficiencia, reproducibilidad y finalmente son relativamente sencillos de preparar (Wang *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2001; Ibáñez *et al.*, 1996), por lo anterior para este trabajo se utilizó una transfección con lipofectamina como estrategia de transfección no viral.

Las condiciones para transfectar una línea celular varían dependiendo de la misma (Bakhshandeh *et al.*, 2012) y son muchos los parámetros que pueden afectar la eficiencia de la transferencia de genes por lipofección; entre ellos, la composición de los liposomas, la correlación liposoma/ADN, la concentración del lipocomplejo, el protocolo de tratamiento de las células y el medio utilizado para la transfección (Farago *et al.*, 2008); tomado en cuenta estas variables se plantearon las condiciones de transfección con la utilización del plásmido pEGFPC-1 el cual ha demostrado ser un excelente vector dada su capacidad para generar transfecciones de alta intensidad de fluorescencia (Genové *et al.*, 2005).

Como primer punto nos preguntamos qué medio de cultivo era el más adecuado para obtener una alta eficiencia de transfección usando lipofectamina. En la literatura se describe que la mayoría de las lipofecciones se llevan a cabo, al menos en etapas tempranas del procedimiento, en medio

libre de suero (Hawley-Nelson *et al.*, 2008) dado que las proteínas séricas pueden interactuar con las bicapas de la membrana de los liposomas desestabilizándolas, bloquear la asociación del lipocomplejo con las membranas celulares reduciendo su capacidad de agregación a la membranas o incluso, reducir la absorción de las vesículas endosomales (Wang, 2013; Vitiello *et al.*, 1998), lo que se traduce en una baja eficiencia de transfección. Así, el uso de un medio bajo en proteínas y libre de suero como punto de partida de transfección parecía ser la mejor opción sin embargo, al hacer una revisión bibliográfica, encontramos diversas opiniones sobre el tipo de medio que debía usarse en transfecciones con lipofectamina; de acuerdo con el fabricante de este (Invitrogen-Life Technologies, 2013) optiMeM (era el medio comercial especializado para transfección libre de suero) o DMEM, pero Hawley-Nelson y colaboradores (2008) además del optiMEM sugieren la utilización del medio propio de las células, aun cuando algunos aditivos contenidos en el medio podían interferir con las cargas del lipocomplejo, en nuestro caso IMDM. Bajo esta premisa, probamos los 3 medios sin y con diferentes proporciones de SFB puesto que el fabricante de optiMEM (Gibco-Life Technologies, 2013) sugiere el uso de bajos porcentajes de SFB de así necesitarlo el cultivo celular.

Bajo nuestras condiciones experimentales, encontramos que la combinación de IMDM en ausencia de SFB, tiene la mayor eficiencia de transfección (32.9% GFP+) en evaluaciones 72 h post-transfección; estos resultados son similares a lo obtenido por Asgharian y colaboradores (2014), en donde utilizando lipofectamina en la línea celular HeLa (cáncer cérvico-uterino humano) tuvieron una eficiencia de 31.66%; sin embargo ese resultado se contrapone a lo establecido por el fabricante en donde las líneas celulares adherentes resultan con mayor eficiencia que las líneas celulares en suspensión (Invitrogen-Life Technologies, 2013). Por su parte, los resultados obtenidos en optiMEM así como de las muestras que al inicio de la transfección tuvieron el mayor porcentaje de SFB (0.3%) que mostraron baja a nula positividad a GFP, concuerdan con estudios donde se muestra que células lipofectadas en presencia de suero, rinden una baja eficiencia de transfección (Medina-Kauw *et al.*, 2005).

De manera interesante, bajo nuestras condiciones experimentales la transfección no alteró las propiedades morfológicas ni de cultivo de la línea celular leucémica WEHI-3, estos resultados contrastan al estudio realizado por Bakhshandeh y colaboradores (2012) en donde muestran que la transfección de células troncales mesenquimales de médula ósea y células de cordón umbilical se acompaña de cambios morfológicos.

La mayoría de los estudios donde se transfecta a células leucémicas con fines de identificación, la expresión del gen reportero se evalúa a las 24h (Valeri *et al.*, 2010) y como máximo a las 72h (Bakhshandeh *et al.*, 2012), considerando que un cocultivo de células WEHI-3 y CMN debía permanecer al menos por 120h nos preguntamos si la selección con antibiótico podría incrementar la eficiencia de expresión de GFP y el tiempo máximo en que las células portaban el vector. Luego de seleccionar las células WEHI-3GFP por adición de Geneticina (G418), fue posible conseguir hasta un 99% de células positivas para el transgen GFP; otros estudios de transgénesis o transferencia génica realizados sobre WEHI-3 muestran que aun empleando un vector viral no se consiguen altos porcentajes de eficiencia como lo muestra Valeri y colaboradores (2010) con un lentiviral 11.2% GFP+. De manera interesante, García-Castro y colaboradores (2000) usando un vector adenoviral consiguen 100% de células GFP+ mediante múltiples infecciones con una duración de 12 días de expresión, en contraste nuestros resultados muestran 90% de células WEHI-3GFP por más de 15 semanas post-transfección lo cual es poco común en estudios de lipofección, ya que no reportan más de dos semanas post-transfección (Kosaka *et al.*, 2010).

No obstante que las células WEHI-3 transfectadas permanecen positivas para GFP por un largo periodo de tiempo, la expresión del transgen es dependiente de la presencia del antibiótico, lo cual sugiere que se trata de una transfección transitoria (Kim *et al.*, 2010; Hawley-Nelson *et al.*, 2008). Es conocido que las líneas celulares, en particular las células leucémicas expresan mecanismos moleculares que las hacen resistentes a los procesos de transformación genética (Medina-Kauw *et al.*, 2005). Por lo anterior, no es extraño que en ausencia de la presión de selección con el antibiótico, las células WEHI-3 sean negativas para GFP. Sería interesante evaluar la presencia del vector en células WEHI-3GFP mediante la búsqueda de los genes Tn5 (gen que otorga la resistencia a G418) y el gen EGFP (gen que otorga la expresión de la Proteína Verde Fluorescente) además de conocer si dichos genes no sufrieron modificaciones epigenéticas que modificaran su expresión.

Una vez seguros de poder identificar las células WEHI-3 mediante su positividad para GFP, las cocultivamos con CMN en presencia y ausencia de CasNa y evaluamos por citometría de flujo, el porcentaje de células verde fluorescentes. De manera notable, la presencia de CasNa redujo en 44% y 50% las células fluorescentes en cultivos WEHIGFP y CCGFP respectivamente lo que nos sugiere una inhibición de la proliferación de las células leucémicas en el cultivo individual pero más interesante aún, que el CasNa reduce el número de células WEHI-3GFP pero no de células

hematopoyéticas normales en el CCGFP puesto que las evaluaciones de cristal violeta muestran que la proliferación del CC en presencia de CasNa es similar a la del CMN con CasNa.

Por otro lado, encontramos que la fluorescencia basal de cultivos de células WEHI-3 parentales y CMN se incrementa en presencia de CasNa, de 0.9% a 2.9% en WEHI-3 parental y de 2.5% a 9.0% en CMN. En este sentido, Aubin y colaboradores (1979) sugieren que un desplazamiento en la región espectral fuera del rango de autofluorescencia puede ser debido a la nicotinamida adenina dinucleotido (NADH) (ya que emite luz fluorescente en la gama de 420 a 480 nm) (Mayevsky & Rogatsky, 2007). El NADH es un compuesto celular requerido para el crecimiento y es activamente sintetizado por las células en proliferación o metabólicamente más activas (Aubin *et al.*, 1979), así considerando que CMN en presencia de CasNa incrementan tanto su proliferación como actividad metabólica como mostramos en este estudio, existe la posibilidad de que el incremento en la autofluorescencia sea debido a NADH. De manera interesante, se ha reportado que el NADH, no solo está involucrado en procesos de proliferación sino también de muerte celular (Sánchez & Arboleda, 2008), pero cuando analizamos la integridad del material genético en cultivos de CMN en presencia de CasNa no encontramos evidencias de fragmentación nucleosomal; por el contrario tanto en WEHI-3GFP y CCGFP con CasNa observamos el patrón característico de fragmentación del DNA que es compatible con la inducción de apoptosis (Zhou *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2011). Sería interesante evaluar en el futuro si en efecto, existe modulación de la expresión de NADH que nos permita explicar por un lado, el incremento en la fluorescencia de cultivo de CMN en presencia de CasNa en ausencia de fragmentación del DNA y por el otro, si existe relación entre NADH y la inducción de apoptosis en células leucémicas cultivadas en presencia de CasNa. La fragmentación del ADN en el patrón de bandeado conocido como “escalera” es la prueba contundente de inducción de apoptosis, lo que es claro que ocurre en cultivos de WEHI-3GFP con CasNa pero desconocemos el mecanismo molecular involucrado, sería interesante evaluar en el futuro la ruta de inducción de apoptosis inducida por CasNa y si esta ruta es activada en las CMN pero no concluye hasta la inducción de fragmentación como se sabe puede ocurrir (Gao *et al.*, 2002; Gautam *et al.*, 2000).

Nuestros resultados nos permiten sugerir que son las células WEHI-3GFP quienes sufren la fragmentación del material genético no obstante, considerando el nivel de expresión de GFP en el CCGFP después de 120 h en presencia de CasNa, existe la posibilidad de que persistan células leucémicas WEHI-3GFP viables. Estos resultados concuerdan con un estudio reciente donde se muestra que el CasNa prolonga la supervivencia en su modelo de leucemia *in vivo*, reduciendo las

manifestaciones de enfermedad no obstante que persisten células en la médula ósea del ratón, con la capacidad de proliferar *in vitro* en ausencia de factores de crecimiento exógenos (Ledezma-Martínez, 2013), lo que se considera como una evidencia de la presencia de células leucémicas en la médula ósea (Gautam *et al.*, 2000) Por lo anterior, sería interesante evaluar en el futuro si, CCs que fueron expuestos a CasNa inducen el mismo cuadro de enfermedad que la línea parental WEHI-3 cuando es inoculada en ratones inmunocompatibles BALB/c (Weng *et al.*, 2013) o por el contrario, las células WEHI-3 que persisten en el CC con CasNa, pierden su capacidad leucemogénica, lo cual abriría la posibilidad del uso de CasNa para purgar *in vitro* de células malignas una muestra de CMN con fines de trasplante autólogo.

Es conocido que los compuestos químicos capaces de eliminar a las células cancerosas afectando las vías de apoptosis son considerados prometedores anticancerígenos. Recientemente, al eliminación selectiva de las células de AML mediante la inducción de la apoptosis ha surgido como una estrategia valiosa para la lucha contra la AML (Hsiao *et al.*, 2014; Carter *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Así moléculas antileucémicas en uso clínico para tratar la AML tales como la antraciclina la cual es 2.7 veces más tóxica sobre cultivos de células leucémicas que sobre progenitores mielomonocíticos *in vivo* (Valeri *et al.*, 2010; Faujan *et al.*, 2010;). Por otro lado, datos bibliográficos reportan que moléculas en investigación como el ácido betulínico reduce la actividad metabólica de las células leucémicas, pero requiere concentraciones 10 veces más altas para lograr el mismo efecto sobre linfocitos humanos normales (Faujan *et al.*, 2010), el resveratrol induce apoptosis sobre líneas leucémicas y requiere 4 veces la concentración de IC₅₀ para causar daño sobre células sanas de MO de ratón (Gautam *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2002), mientras que la curcumina induce apoptosis en más del 80% de células CD34+ de pacientes con AML, mientras que la misma concentración es citotóxica en solo el 20% de las células normales (Wright *et al.*, 2013). Pero de nuestro conocimiento, hasta el momento no se ha descrito algún antileucémico que induzca apoptosis en células leucémicas pero induzca la proliferación de células hematopoyéticas normales como lo hace el CasNa, una propiedad al parecer exclusiva de este, por lo que supera las expectativas de cualquier anticancerígeno para el tratamiento de la AML, lo cual le da una ventaja competitiva respecto a otras moléculas en investigación.

CONCLUSIONES

- El CasNa inhibe la proliferación de las células leucémicas WEHI-3 tanto en CC como en el cultivo individual, pero potencia la proliferación de CMN.
- El CC en presencia de CasNa, muestra similitudes en proliferación y actividad metabólica respecto a cultivos individuales de CMN pero no de células leucémicas WEHI-3.
- El CasNa induce apoptosis en las células leucémicas WEHI-3 y en CC, pero no en CMN.
- El CasNa conserva la capacidad para bloquear la hematopoyesis leucémica y favorecer la normal aun en un sistema de cultivo mixto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akita H, Hatakeyama H, Khalil I, Yamada Y, Harashima H. (2011). 4.425-Delivery of Nucleic Acids and Gene Delivery. *Comprehensive biomaterials*; 4:411-444.
- Alfaro ME, García CC, Dueñas GA. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Cáncer*; 46 (4):275-280.
- 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.
- Armenta Ruiz E, Varela Echavarría A, Martínez de la Escalera G, Loske Mehling A. (2006). Transfección de células por medio de ondas de choque. *Revista mexicana de física*; 52(4): 352-358.
- Aschkenasy A. (1971). Effects compares de la caseine et de divers melanges aminoacides sur la restauration de l'erythropoiese de la neutropoiese et de la lymphopoiese chez des rats prepares par une privation prolongee de proteines. *Nouvelles etudes. Archives des Sciences Physiologiques*; 25: 415-430.
- Asgharian A, Banan M, Najmabadi H. (2014). Optimizing A Lipocomplex-Based Gene Transfer Method into HeLa Cell Line. *Cell Journal (Yakhteh)*; 15(4): 372-379.
- Aubin J. (1979). Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*; 27(1): 36-43.
- Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M, Ghaemi N. (2012). A comparative study on nonviral genetic modifications in cord blood and bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*; 64(5): 523-540.
- BD BiosciencesClontech. (2002). pEGFP-C1 vector information. Protocol # PT3026-5, Versión #PR29973 Disponible en: <http://www.bdbiosciences.com>. Acceso noviembre 23, 2014.
- Bellantuono I. (2004). Hematopoietic stem cells. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 36:607-620.
- Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, Iscove N. (2010). Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potencial. *Cell Stem Cell*; 6(1):48-58.

- Bereridge R, Urtasun J. (2003). Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos secundarios al tratamiento oncológico. In *Anales de medicina interna*; 20(5): 257-268.
- Bergen J, Schaffer D, (2011). Engineering viruses for gene therapy. *Biologically Inspired and Biomolecular Materials. Comprehensive Biomaterials*; 2: 17-33.
- Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. (1988). Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro*; 2(1): 1-6.
- Bruserud O, Rynningen A, Wergeland L, Glenjen N, Gjertsen B. (2004). Osteoblasts increase proliferation and release of pro-angiogenic interleukin 8 by native human acute myelogenous leukemia blasts. *Haematologica*; 89(4): 391-402.
- Can A. (2008). Hematopoietic stem cells niches: interrelations between structure and function. *Transfusion and apheresis science*; 38 (3): 261-268.
- Carter B, Mak D, Shi Y, Fidler J, Chen R. (2012). MRx102 a triptolide derivative has potent antileukemic activity *in vitro* and in a murine model of AML. *Leukemia*; 26: 443–450.
- Castro Díaz S. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis doctoral. PUJ Facultad de ciencias Colombia 2006.
- Cavallo M, Fava D, Monetini L, Barone F, Pozzilli P. (1996). Cell-mediated immune response to β casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *The Lancet*; 348(9032): 926-928.
- Challen G, Boles N, Chambers S, Goodell M. (2010). Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF- β 1. *Cell stem cell*; 6(3):265-278.
- Cheng M, Hourigan C, Smith J. (2014). Adult Acute Myeloid Leukemia Long-term Survivors. *Journal of leukemia (Los Angeles, Calif.)*; 2(2):2-15.
- Cheshier S, Morrison S, Liao X, Weissman I. (1999). *In vivo* proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 96(6): 3120-3125.
- Chotinantakul K, Leenansaksiri W. (2012). Hematopoietic stem cell development, niches and signaling pathways. *Bone marrow research 2012*: 270425.
- Córdova-Galaviz Y, Ledesma-Martínez E, Aguiñiga-Sánchez I, Soldevila-Melgarejo G, Soto-Cruz I, Weiss-Steider B, Santiago-Osorio E. (2014). Sodium Caseinate Induces Increased Survival in Leukaemic Mouse J774 Model. *In Vivo*; 28(5): 819-825.

- Cragg G, Newman D. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of ethnopharmacology*; 100(1): 72-79.
- Cross M, Gill H. (2000). Immunomodulatory properties of milk. *British Journal of Nutrition*; 84(S1): 81-89.
- David G. (2005). Splenic arterial interventions: anatomy indications technical, considerations and potential considerations. *Radiographics*; 25: S191-S211.
- Deschler B, Lübbert M. (2006). Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cáncer*; 107(9): 2099-2107.
- Domínguez MV. (2012) Evaluación de la actividad del caseinato de sodio (CasNa) sobre la inducción de mielopoyesis y linfopoyesis. Tesis de doctorado. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Domínguez-Meléndez V, Silvestre-Santana O, Moreno-Fierros L, Aguiñiga-Sánchez I, Martínez L., Marroquín-Segura R, Santiago-Osorio E. (2012). Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis. *Inflammation Research*; 61(4): 367-373.
- Donahue R, Wang E, Stone D, Kamen R, Wong G, Sehgal P, Clark S. (1986). Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF; *Nature* (321): 872-875.
- Ewert K, Ahmad A, Bouxsein N, Evans H, Safinya C. (2008). Non-viral gene delivery with cationic liposome–DNA complexes. *Gene Therapy Protocols, Methods in Molecular Biology*; (433): 159-175.
- Farago O, Ewert K, Ahmad A, Evans H, Gronbech N, Safinya C. (2008). Transitions between distinct compaction regimes in complexes of multivalent cationic lipids and DNA. *Biophysical journal*; (95): 836-846.
- Faujan N, Alitheen N, Yeap S, Ali A, Muhajir A, Ahmad F. (2010). Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca cajuput* on human myeloid leukemia (HL-60) cell line. *African Journal of Biotechnology*; 9(38): 6387-6396.
- Ferrara F, Schiffer C. (2013). Acute myeloid leukaemia in adults. *The Lancet*; 381(9865): 484-495.
- Fewell J, Matar M, Slobodkin G, Han S, Rice J, Hovanes B, Lewis D, Anwer K. (2005). Synthesis and application of a non-viral gene delivery system for immunogene therapy of cancer. *Journal of Controlled release*; 109: 288-298.

- Fimognari C, Turrini E, Sestili P, Calcabrini C, Carulli G, Fontanelli G, Hrelia P, (2014). Antileukemic Activity of Sulforaphane in Primary Blasts from Patients Affected by Myelo- and Lympho-Proliferative Disorders and in Hypoxic Conditions. *PLoS one*; 9(7): 1-13.
- Francke A, Herold J, Weinert S, Strasser R, Braun-Dullaeus R. (2011). Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*; 59(9): 813-825.
- Gao X, Xu Y, Divine G, Janakiraman N, Chapman R, Gautam S. (2002). Disparate *in vitro* and *in vivo* antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolic compound found in grapes. *The Journal of nutrition*; 132(7): 2076-2081.
- García-Castro J, Segovia J, García-Sánchez F, Lillo R, Gómez-Navarro J, Curiel D, Bueren J. (2001). Selective transduction of murine myelomonocytic leukemia cells (WEHI-3B) with regular and RGD-adenoviral vectors. *Molecular Therapy*; 3(1): 70-77.
- Gautam S, Xu Y, Dumaguin M, Janakiraman N, Chapman R. (2000). Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for *ex vivo* bone marrow purging. *Bone marrow transplantation*; 25(6): 639-645.
- Genové G, Glick B, Barth A. (2005). Brighter reporter genes from multimerized fluorescent proteins. *Biotechniques*; 39(6): 814-818.
- Gibco-Life Technologies (2013). OptiMEM I Reduced Serum Medium. Disponible en: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/OPTI_MEM_I_reduced_serum_PL.pdf. Acceso septiembre 29, 2013.
- Gillies R, Didier N, Denton M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical biochemistry*; 159(1): 109-113.
- Gimenez A. (1986). Sarcoma granulocítico o cloroma. *Cancer*; 58:2697-2709.
- Goldberg J, McGuire L, Williams W. (1981). Myeloid differentiation of human blood mononuclear cells in liquid culture. *Blood*; 57(3): 497-504.
- Gregoriadis G, Perrie Y. (2010). Liposomes. *Encyclopedia of life sciences*.
- Griessinger E, Anjos-Afonso F, Pizzitola I, Rouault-Pierre K, Vargaftig J, Taussig D, Gribben J, Lassailly F, Bonnet D. (2014). A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms. *Stem Cells Translation Medicine*; 3(4):520-529.

- Gutiérrez M. (2006). Síndromes hematológicos. Su relación con las enfermedades que lo producen. Ed. Prado. p.p. 473-491.
- Hall C, Hedrick T. (1971). *Drying of milk and milk products* (No. 2nd edition). Westport, Connecticut, USA: AVI Publishing Co. Inc.
- Hanahan D, Weinberg R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144(5): 646-674.
- Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Moore M. (2008). Transfection of cultured eukaryotic cells using cationic lipid reagents. *Current Protocols in Molecular Biology*. 81(9): 1-17.
- Hira T, Hara H, Tomita F, Aoyama Y. (2003). Casein binds to the cell membrane and induces intracellular calcium signals in the enteroendocrine cell: a brief communication. *Experimental Biology and Medicine*; 228(7): 850-854.
- Honry H, Ruck M, Kaiserling E. (1990). Immunohistology of human spleen after bone marrow transplantation for leukemics with special reference to early post-transplantation period. *Pathology research and practice*; (186): 775-783.
- Hsiao P, Chou Y, Tan P, Lee W, Yang S, Chow J, Chen H, Lin C, Lee L, Chien M. (2014). Pterostilbene Simultaneously Induced G0/G1-Phase Arrest and MAPK-Mediated Mitochondrial-Derived Apoptosis in Human Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. *PloS one*; 9(8): 105342-105354.
- Hughes N, Wickramasinghe S, Hatton C, (1991). *Lecture Notes on Hematology*. Ed. Blackwell Scientific Publications, London. 225 pp.
- Ibañez M, Santiago R, Wong C, Baeza I, Gariglio P, Chávez P. (1996). Spermidine-condensed DNA and cone-shaped lipids improve delivery and expression of exogenous DNA transfer by liposomes. *Biochemistry and cell biology*; 74(5): 633-643.
- Invitrogen-Life Technologies, (2013). Lipofectamine LTX & Plus Reagent, protocol pub. No. MAN0007822. Disponible en: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/LipofectamineLTX_PLUS_Reag_protocol.pdf. Acceso septiembre 29, 2013.
- Jaso J, Wang S, Jorgensen J, Lin P. (2014). Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. *Bone marrow transplantation*; (49): 1129–1138.
- Jinsmaa Y, Yoshikawa M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. *Peptides*; 20(8): 957-962.

- Kantarjian H, Dixon D, Keating M, Talpaz M, Walters R, McCredie K, Freireich E, (1988). Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*; (61): 1441-1446.
- Karra D, Dahm R. (2010). Transfection Techniques for Neuronal Cells. *The journal of Neuroscience*; 30 (18): 6171-6177.
- Kayser H, Meisel H. (1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *Federation of European biochemical society's letters*; 383(1): 18-20.
- Kim T, Eberwine J. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*; 397(8): 3173-3178.
- Koch S, Pohl P, Cobet U, Rainov N (2000). Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects. *Ultrasound in Medicine & Biology*; 26 (5): 897-903.
- Koletzko B, Aggett P, Bindels J, Bung P, Ferre P, Gil A, Strobel S. (1998). Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British Journal of Nutrition*; 80(1): S5.
- Kondo M, Wagers A, Manz M, Prohaska S, Scherer D, Beilhack G, Shizuru J, Weissman I. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology*; 21(1): 759-806
- Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *Journal of Biological Chemistry*; 285(23): 17442-17452.
- Kueng W, Silber E, Eppenberger U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical biochemistry*; 182(1): 16-19.
- Kushlinskii N, Nemtsova M. (2014) Molecular biological characteristics of cancer. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*; (1-2):5-15.
- Kvestad H, Evensen L, Lorens J, Bruserud Ø, Hatfield K. (2014). *In Vitro* Characterization of Valproic Acid, ATRA, and Cytarabine Used for Disease-Stabilization in Human Acute Myeloid Leukemia: Antiproliferative Effects of Drugs on Endothelial and Osteoblastic Cells and Altered Release of Angioregulatory Mediators by Endothelial Cells. *Leukemia research and treatment*; 2014: 3479-3493.

- Lagunez S. (2004). Estimulación de la hematopoyesis medular y extramedular inducida por el caseinato de sodio (CasNa) en ratones BALB/c. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza UNAM.
- Larsson J, Karlsson S. (2005). The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*; 24(37): 5676-5692.
- Ledesma-Martínez E. (2013). Efecto *in vitro* e *in vivo* del caseinato de sodio (CasNa) en la proliferación de células leucémicas WEHI-3 y células de médula ósea normal de ratón. Tesis de doctorado. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Ledesma-Martínez E, Pérez-Cordero C, Córdova-Galaviz Y, Sánchez-Tellez G, Huerta-Yepey S, Aguiñiga-Sánchez I, Santiago-Osorio E. (2012). Casein induces the proliferation of bone marrow mononuclear cells, apoptosis of WEHI-3 leukaemic cells and increased survival in a leukaemia mouse model. *Oncology letters*; 4(3): 461-466.
- Lee P, Costumbrado J, Hsu C, Kim Y. (2011). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments: JoVE*; (62): 9400-9405.
- Legorreta M, Martínez F, Hernández F, Zentella A. (2012). Los vectores virales y la transgénesis. *Vertientes Revista especializada en ciencias de la salud*; 15 (1): 5-14.
- Lewis S, Van Epss D. (1983). Demonstration of specific receptors for fluoresceinated caseinon human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation* (7): 363-375.
- Lickliter J, Wood N, Johnson L, McHugh G, Tan J, Wood F, Wickham N. (2003). HA14-1 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death. *Leukemia*; 17(11): 2074-2080.
- Liebermann D, Hoffman-Liebermann B. (1989). Proto-oncogene expression and dissection of the myeloid growth to differentiation developmental cascade. *Oncogene*; 4(5): 583-592.
- Ling X, Wang Y, Dietrich M, Andreeff M, Arlinghaus R. (2006). Vaccination with leukemia cells expressing cell-surface-associated GM-CSF blocks leukemia induction in immunocompetent mice. *Oncogene*; 25(32): 4483-4490.
- Mayani H, Flores E, Pelayo R, Montesinos J, Flores P, Chávez A, (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*; (2): 95-107.
- Mayani H, (2003). A glance into somatic stem cell biology: Basic Principles, new concepts and clinical relevance. *Archives of medical research*; 34(1): 3- 15

- Mayevsky A., Rogatsky G.(2007). Mitochondrial function *in vivo* evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *American journal of physiology-Cell physiology*, 292(2), C615-C640.
- Mayle A, Luo M, Jeong M, Goodell M, (2012). Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. *Cytometry Part A*, 83(1):27-37.
- Medina-Kauwe L., Xie J., Hamm-Alvarez S. (2005). Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Therapy*, 12(24), 1734-1751.
- Metcalf D. (1986). The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*, 67(2), 257-267.
- Metcalf D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood*, 111(2), 485-491.
- Montrone C, Kokkaliaris K, Loeffler D, Lechner M, Kastenmüller G, Schroeder T, Ruepp A, (2013). HSC-explorer: a curated database for hematopoietic stem cells. *PLoS One*, 8(7): 1-8.
- Murphy R, Messer A (2001). Gene Transfer Methods for CNS Organotypic Cultures: A Comparison of Three Nonviral Methods. *Molecular Therapy*; 3(1): 113-121
- NCI (National Cancer Institute) (2009). Lo que usted necesita saber sobre la leucemia, Departamento de salud y servicios humanos de los EE. UU. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/educacion-para-pacientes/necesita-saber-leucemia>. Acceso septiembre 18, 2014.
- Nervi B, Link D, Dipersio J. (2006). Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *Journal of cellular biochemistry* 99(3): 690-705.
- Okano M, Ohnata H, Sasaki R. (1992). Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursors cells. *Journal of Nutrition*; (122):1376-1383.
- Orkin H, Zon LI, (2008). Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*; 132(4):631-644.
- 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(3): 235-242.
- Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G, Ricevuti G. (1992). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Rivista europea per le scienze mediche e farmacologiche European review for medical and pharmacological sciences Revue européenne pour les sciences médicales et pharmacologiques*; 15(2): 71-81.

- Pelayo R, Vadillo R, (2011). El Sistema hematopoyético a partir de células troncales, en: Pelayo R, Santa-Olaya J, Velasco I, et al. 2011. Células troncales y medicina regenerativa. México, Pp 144 ISBN 978-607-02-2568-0
- Pessi T, Isolauri E, Sütas Y, Kankaanranta H, Moilanen E, Hurme M. (2001). Suppression of T-cell activation by Lactobacillus rhamnosus GG-degraded bovine casein. International immunopharmacology; 1(2): 211-218.
- Pusic I, Disperso J. (2010). Update on clinical experience with AMD3100 SDF-1/CXCL12-CXCR 4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. Current opinion in hematology; 17(4): 319-326.
- Ramos-Mandujano G, Weiss-Steider B, Melo B, Córdova Y, Ledesma-Martínez E, Bustos S, Santiago-Osorio E. (2008). Alpha-, beta-and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. Immunobiology; 213(2): 133-141.
- Read D, Zealand E. (2000). Use of antibiotic resistance marker genes in genetically modified organisms. ERMA New Zealand.
- Read L, Lord A, Brantl V, Koch G. (1990). Absorption of B-casomorphins from autoperfused lamb and piglet small intestine. American Journal of Physiology; (259): G443-G452.
- Robak T, Wierzbowska A. (2009). Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. Clinical therapeutics; (31): 2349-2370.
- Ruiz-Argüelles G, Gómez-Almaguer D, Ruiz-Delgado G, Tarin-Arzaga L. (2007). Ocho años de experiencia con el “método Mexicano” en la realización de trasplantes de células hematopoyéticas alogénicas. Gaceta Medica Mexicana; (143): 231-235.
- Sachs L, Lotem J. (1993). Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: new implications for therapy. Blood; 82(1): 15-21.
- Sánchez R, Arboleda G. (2008). Mitocondria y muerte celular. Publicación Científica En Ciencias Biomédicas Colombia; 6(10): 190-200.
- Sarabani H, Izumchenco E, Wang Q, Kreinin R, Steiner M, Barvish Z, Danilenko M. (2006). Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia International Journal of Cancer; (118): 3012-3021.
- Setzer W, Setzer M. (2003). Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. Mini reviews in medicinal chemistry; 3(6): 540-556.

- Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H, (1995). Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant Journal*; (8): 777-784.
- Shipley J, Butera J. (2009). Acute myelogenous leukemia. *Experimental hematology*; 37(6): 649-658.
- Shuettpeiz G, Link C, (2013). Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation. *Frontiers in Immunology*; (4):1-9.
- Siegel M, Deepa D, (2013). Cancer statistics, 2013. *A Cancer Journal for Clinicians*; (63): 1-11.
- Spangrude G, Heimfeld S, Weissman I. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*; 241(4861): 58-62.
- Stanović S, Boranić M. (1999). Neuropeptides, endogenous opioid peptides and cell proliferation. *Lijecnicki vjesnik*; 121(3): 82-87.
- Stone R, O'Donnell M, Sekeres M. (2004). Acute myeloid leukemia. *ASH Education Program Book*; (1): 98-117.
- Tallman M, Gilliland D, Rowe J. (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*; 106(4): 1154-1163.
- Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. (2010). Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry; Part A*, 77(1): 6-10.
- Thomas E, Miller L, Eaves J, (1999). Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. *Methods*; (17): 202-218.
- Tima S, Ichikawa H, Ampasavate C, Okonogi S, Anuchapreeda S. (2014). Inhibitory Effect of Turmeric Curcuminoids on FLT3 Expression and Cell Cycle Arrest in the FLT3-Overexpressing EoL-1 Leukemic Cell Line. *Journal of natural products*; 77(4): 948-954.
- Tros de Ilarduyaa C, Sun Y, Düzgünes N.(2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; (40): 159-170.
- Valeri A, Alonso M, Cerrato L, Martínez S, Bueren J, Albella B (2010). Development of an *in vitro* model for the simultaneous study of the efficacy and hematotoxicity of antileukemic compounds. *Toxicology Letters*; (199): 317-322.
- Van Furth R, Van chadewijk-nieuwstad M, Claasen E, Cornelisse C, Nibbering P. (1985). Morphological, cytochemical, functional and proliferative characteristics of four murine macrophagelike cell lines. *Cellular immunology*; (90): 339-357.

- Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz M, Porwit A, Bloomfield C. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*; 114(5): 937-951.
- Vitiello L, Bockhold K, Joshi P, Worton R. (1998). Transfection of cultured myoblasts in high serum concentration with DODAC: DOPE liposomes. *Gene therapy*; 5(10): 1306-1313.
- Wang E. (2013). Mediated Liposome for Gene Delivery to Mice Brain Part I. Design and Characterization of Liposome-DNA Complexes. *Global Journal of Medical Research*; 13(2).
- Warner N. (1979). *Principios de la tecnología de lácteos*. México: AGT editor.
- Warner N, Moore M, Metcalf D. (1969). A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB/c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *Journal of the National Cancer Institute*; 43(4): 963-982.
- Weisman I. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*; (287):1442-1446.
- Weng X, Shen Y, Sheng Y, Chen B, Wang J, Li J, Chen S.(2013). Prognostic significance of monitoring leukemia-associated immunophenotypes by eight-color flow cytometry in adult B-acute lymphoblastic leukemia. *Blood cancer journal*; 3(8): 133-142.
- Wintrobe M, (2009). *Clinical Hematology*. 8th ed. Philadelphia Lea y Febiger. Pp. 35 ISBN: 978-0-7817-6507-7
- Wong C. (2008). Tesis licenciatura “Estudio de fármacos que modifican la transfección genética mediada por lipofección”. Instituto Politécnico Nacional 2008: 1-75
- Wong C, Seow H, Liu A, Husband A, Smithers G, Watson D. (1996). Modulation of immune responses by bovine β -casein. *Immunology and cell biology*; 74(4): 323-329.
- Wright L, Frye J, Gorti B, Timmermann B, Funk J. (2013). Bioactivity of turmeric-derived curcuminoids and related metabolites in breast cancer. *Current pharmaceutical design*; 19(34): 6218-6225.
- Yin T, Li L, (2006). The stem cell niches in bone. *The Journal of Clinical Investigation*. (116): 1195-1201.
- Zambrano I, Santiago E, Weiss B, Cáceres J, (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Revista de Investigación Clínica*. (51): 53-68.
- Zhang S, Zhang Y, Zhuang Y, Wang J, Ye J, Zhang S, Han Y. (2012). Matrine induces apoptosis in human acute myeloid leukemia cells via the mitochondrial pathway and Akt inactivation. *PloS one*, 7(10), 46853.

- Zhou Y, Mao S, Li S, Ni X, Li B, Liu W. (2014). Programmed cell death: A mechanism for the lysigenous formation of secretory cavities in leaves of *Dictamnus dasycarpus*. *Plant Science*; (225): 147-160.

APÉNDICE I

Preparación de reactivos y soluciones

Inactivación de suero fetal bovino (SFB)

El SFB (Gibco, USA) se deja descongelar a temperatura ambiente, una vez descongelado se pasa a un baño maría a 57°C por 30 minutos; esto se hace para inactivar proteínas del complemento que pueden interferir con el crecimiento celular. Finalmente se separa en alícuotas, para su mejor manipulación, conservándose a 4°C.

Solución buffer de fosfatos (PBS)

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Los componentes son 8.0g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2g de cloruro de potasio (KCl) y 0.2g de fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄); se diluyen en un volumen final de 1 litro de agua milli-Q. Finalmente se ajusta el pH a 7.3 utilizando fosfato monoácido de sodio (Na₂HPO₄) y se afora a una volumen de 1000 mL. Esta solución se esteriliza por medio de autoclave durante 20 min, la solución se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

Solución de glutaraldehído al 1.1%

Se utiliza para fijar a las células que serán evaluadas por la técnica de cristal violeta. Se toman 1.57mL de glutaraldehído (70% v/v) se le agrega 98.43 mL de agua milli-Q y se agita suavemente. La solución es fotoreactiva por lo tanto debe ser conservada en un frasco ambar en un lugar fresco a temperatura ambiente hasta su uso.

Solución cristal violeta 0.1%

El cristal violeta se utiliza para teñir a las células fijadas al sustrato de la placa de 96 pozos, este penetra la célula y se intercala en el ADN mediante interacción de cargas ya que el ADN tiene carga negativa y el cristal violeta tiene carga positiva. Se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200mM pH 6, que se prepara al disolver 3.96g de NaOH a 4.28 mL de ácido fórmico. Una vez preparada esta solución se adiciona 1g de cristal violeta y se afora a 500 mL con agua milli-Q. Finalmente la solución se almacena a temperatura ambiente hasta su uso.

Solución ácido acético 10%

El ácido acético se utiliza para diluir el colorante de las células y ser evaluadas en un lector de placas. Para realizar 100 mL de ella, se toman 90 mL de agua milli-Q y se adicionan 10 mL de ácido acético.

APÉNDICE II

Participación en congresos



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



CONSTANCIA

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través del Departamento
de Educación Continua

a *Aide López García, Edgar Ledesma Martínez, Itzen
Aguñiga Sánchez, Benny Weiss Steider, Edelmiro
Santiago Osorio*

Por la presentación del **Trabajo en Cartel** "El Papel del CasNa en la
Eliminación Selectiva de Células Leucémicas", dentro del 10º
Congreso de Investigación y VII Reunión de Investigación de Cáncer
en México, el 13 de octubre del año en curso.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 13 de octubre de 2014.

Dr. Victor Manuel Mendoza Núñez
Director



CONACYT



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



CONSTANCIA

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través del Departamento
de Educación Continua

a Aide López García, Edgar Ledesma
Martínez, Itzen Aguiñiga Sánchez, Guadalupe
Gómez García, Edelmiro Santiago Osorio

Por su participación con el trabajo en cartel **“Establecimiento de la Línea Celular WEHI-3GFP Mediante Lipofección”**, dentro del 9º Congreso de Investigación en la FES Zaragoza, el 24 de octubre del año en curso.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 24 de octubre de 2013.

Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez
Director

