



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**Eficiencia del tratamiento combinado de  
caseinato de sodio (CS) con citarabina o  
daunorrubicina para inducir  
sobrevivencia en ratones con leucemia  
avanzada.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**José Luis Lara Castañeda**

**Director de tesis:**

**Dr. Edelmiro Santiago Osorio**

**Ciudad de México, Septiembre 2021.**





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.

## **APOYOS FINANCIEROS**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, de la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, UNAM, bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA UNAM, con clave: IN221017 e IN229820.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Al Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por permitirme entrar al laboratorio, quien fue mi guía y me aportó todos sus conocimientos en este camino; así como brindarme toda su confianza y formar parte de su grupo de trabajo, a pesar de mis inconsistencias, inseguridades y fallas.

A la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez, quien con todos sus conocimientos y seguridad me brindó los aprendizajes para este camino, quien no me dejó caer a pesar de mis inseguridades y que me apoyó siempre que lo necesitaba a pesar de mis tropiezos.

A los miembros del jurado integrado por el Dr. Benny Weiss Steider, La M. en C. Reynalda Roldán Pérez, el Dr. Edgar Ledesma Martínez, la Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez y el Dr. Edelmiro Santiago Osorio quienes, con sus aportaciones y observaciones, se pudo realizar este trabajo.

A la M. en C. Rocío Rivera, a la Dra. Guadalupe Fajardo, a la Dra. Sandra Salazar, a la M. en C. Guadalupe Gómez, al Dr. Edgar Ledesma y al M. en C. Luis Martínez quienes me aportaron grandes conocimientos con paciencia y dedicación y quienes me mostraron que, a pesar de las fallas, nunca hay que rendirse. Gracias por todo su tiempo y confianza.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Frida, Sac, Gaby, Malu, Gus, Michelle, Jair, Lalo, Lamba, Aramiz, Mariana y Candy por todo su tiempo y apoyo en los experimentos, pero, sobre todo, por todos los momentos agradables que pasamos juntos y que a pesar de la situación siempre reíamos. También, por tenerme mucha paciencia, por escucharme y estar siempre que lo necesitaba.

Al bioterio de la FES Zaragoza (UNAM), por el apoyo brindado, así como el suministro de animales para este trabajo, en especial a la MVZ Adriana Altamirano Bautista y el MVZ Román Hernández Meza.

## DEDICATORIAS

A mi mamá -Beatriz- por darme todo tu amor. Gracias por estar siempre en los buenos y malos momentos, porque a pesar de siempre estar muy ocupada, tienes un espacio para mí, para escucharme y apoyarme en todo. Por soportarme en mis tonterías y en mis malos momentos y quien siempre me aconseja para tomar las mejores decisiones.

A mi papá -José- quien, a pesar de siempre estar ocupado, tuviste tiempo para estar conmigo, brindarme los mejores consejos y todo tu apoyo. Que me has soportado en los buenos y malos momentos; pero, sobre todo, me has enseñado que a pesar de que por más grande que sea un problema, se puede reír.

Gracias a ambos, por todo su apoyo y por siempre estar conmigo y que, a pesar de las dificultades, sé que puedo contar con ustedes y que siempre me han querido por quien soy y nunca permitir que alguien más me cambie.

A mis hermanos -Ernesto y Alexis- que siempre han estado conmigo cuidándome y ante cualquier situación o problema, siempre están aquí para apoyarme y escucharme, gracias por todas las risas y los enojos, por soportarme tanto tiempo y enseñarme que la vida no es sencilla.

A mis abuelos -Margarita<sup>†</sup>, Simón<sup>†</sup>, María<sup>†</sup> y José<sup>†</sup>-; a mis Tías -Dulce, Margarita y Laura- y Tíos -Jaime<sup>†</sup> y Enrique-; A mis primos -Rodolfo<sup>†</sup>, Diana, Carlos, Margarita, Rafa, Ernesto y Marisol- y mis sobrinos -Martín, Héctor, Adamary, Sol, Matías, Oswaldo y Uriel-. Gracias a todos ustedes, ya que siempre cuidaron de mí y que, gracias a ustedes, soy lo que soy ahora y sé que puedo contar siempre con ustedes.

A mis amigos de la FES -Axel, Ricardo, Michelle, Gabriela, María Guadalupe, Diana, Ricardo, Aaron, Iván, Eduardo, Roberto, Adriana, Karina, Iván, Ashley, Andrea, Frida, Valeria, Misael-; así como mis amigos de CCH -Lucero, Rocío, Daniela, Jorge, Liliana, Vera, Fernanda- a todos, muchas gracias, por compartir conmigo buenos momentos, por aguantarme en los malos momentos y apoyarme cuando más lo necesitaba, gracias a todos por amistad.

# ÍNDICE

## Contenido

1. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS .....	1
2. LISTA DE ABREVIATURAS .....	3
3. RESUMEN.....	6
4. INTRODUCCIÓN.....	8
5. MARCO TEÓRICO .....	9
5.1. HEMATOPOYESIS .....	9
5.1.1. ORIGEN DE LA HEMATOPOYESIS.....	9
5.1.2. CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS.....	11
5.1.3. MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO.....	13
5.1.4. NICHOS HEMATOPOYÉTICOS: UNIDADES QUE FORMAN PARTE DEL MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO .....	14
5.1.5. REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS .....	21
5.2. LEUCEMIA.....	37
5.2.1. CLASIFICACIÓN.....	39
5.2.2. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	45
5.2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO .....	46
5.2.4. TRATAMIENTO .....	49
5.3. CASEÍNAS Y CASEINATO DE SODIO .....	59
5.3.1. CASEÍNAS Y LEUCEMIA .....	59
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	67
7. JUSTIFICACIÓN .....	68
8. HIPÓTESIS .....	69
9. OBJETIVOS.....	70
9.1. GENERAL .....	70
9.2. PARTICULARES.....	70
10. MATERIALES Y MÉTODO.....	71
11. RESULTADOS .....	75
12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	90
13. CONCLUSIÓN.....	97
14. REFERENCIAS .....	98

## 1. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

**Figura 1.** Sitios de cambio de la hematopoyesis durante la gestación humana

**Figura 2.** Cascada hematopoyética junto con sus principales factores de transcripción, de crecimiento y marcadores celulares.

**Figura 3.** La MO es el sitio primario de mantenimiento de células progenitoras hematopoyéticas y hematopoyesis

**Figura 4.** El modelo logístico de los nichos endosteal y perivascular en la MO

**Figura 5.** Regulación de HSCs por mediadores inflamatorios

**Figura 6.** Rasgos adquiridos en células leucémicas

**Figura 7.** Proliferación de CMN de MO de ratones inoculados o no, con células WEHI-3 en ausencia o presencia de 5 ng/mL de rmlL-3 (PBS o rmlL-3 respectivamente).

**Figura 8.** Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con daunorrubicina, citarabina o CS solos o combinados.

**Figura 9.** Proliferación de CMN de ratones leucémicos a los 30 días post inducción y tratamientos en ausencia o presencia de rmlL-3

**Figura 10.** Proliferación de CMN de ratones leucémicos a los 60 días post inducción y tratamientos en ausencia o presencia de rmlL-3

**Figura 11.** Vista de células en cultivo a los 0, 3, 6 y 9 días post inóculo en ausencia y presencia de rmlL-3 a las 120 h a 40x

**Figura 12.** Ensayo de porcentaje de proliferación celular.

**Figura 13.** Supervivencia general de ratones con leucemia avanzada con compuestos independientes.

**Figura 14.** Supervivencia general de ratones con leucemia avanzada con compuestos combinados.

**Figura 15.** Vista *in situ* de células 40 días después de tratamiento (10 días post inóculo + 30 días de tratamiento) a 10x

**Figura 16.** Porcentaje de proliferación de CMN-MO 40 días post inducción con tratamientos independientes.

**Figura 17.** Porcentaje de proliferación de CMN-MO 40 días post inducción con tratamientos combinados.

**Figura 18.** Porcentaje de inhibición inducida en células leucémicas WEHI-3.

**Tabla 1.** Principales funciones de las células sanguíneas

**Tabla 2.** Factores que regulan el mantenimiento del nicho endosteal

**Tabla 3.** Células participantes del nicho perivascular

**Tabla 4.** Receptores, antagonistas naturales, localización cromosómica y acción biológica de los factores de crecimiento y citocinas

**Tabla 5.** Factores que promueven una regulación negativa sobre las HSCs

**Tabla 6.** Principales características de las leucemias

**Tabla 7.** Clasificación francoestadounidense británico (FAB) de leucémicas agudas

**Tabla 8.** Frecuencia y significancia clínica de los genes mutados en adultos con AML

**Tabla 9.** Test comunes de laboratorio para la evaluación de las leucemias

**Tabla 10.** Grupos de estratificación de riesgo propuesto por ELN, basado en el perfil citogenético y molecular

**Tabla 11.** Tratamiento actual convencional para pacientes con AML

**Tabla 12.** Efectos de la caseína, sus componentes y el CS en la modulación de células normales y leucémicas

## 2. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>μl</b>	Microlitros
<b>AGM</b>	Aorta-Gónada-Mesonefros (por sus siglas en inglés)
<b>ALL</b>	Leucemia linfoide aguda (por sus siglas en inglés)
<b>Allo-HSCT</b>	Trasplante alogénico de células troncales hematopoyéticas (por sus siglas en inglés)
<b>AML</b>	Leucemia mieloide aguda (por sus siglas en inglés)
<b>Ang</b>	Angiopoyetina
<b>BFU</b>	Unidad de formación de blastos (por sus siglas en inglés)
<b>BM-MNCs</b>	Células mononucleares de médula ósea (por sus siglas en inglés)
<b>CD</b>	Antígenos de superficie celular (por sus siglas en inglés)
<b>CEBPA</b>	Gen potenciador de la proteína de union alfa
<b>CFU</b>	Unidad formadora de colonias (por sus siglas en inglés)
<b>Cita</b>	Citarabina
<b>CLL</b>	Leucemia linfoide crónica (por sus siglas en inglés)
<b>CLP</b>	Progenitores linfoides comunes (por sus siglas en inglés)
<b>CML</b>	Leucemia mieloide crónica (por sus siglas en inglés)
<b>CMP</b>	Progenitores mieloides comunes (por sus siglas en inglés)
<b>CS</b>	Caseinato de sodio
<b>Dauno</b>	Daunorrubicina
<b>DNMT3A</b>	Neuroblastoma RAS viral; oncogen homólogo
<b>EMPs</b>	Progenitores eritroides-mieloides (por sus siglas en inglés)
<b>Epo</b>	Eritropoyetina
<b>FLT3-ITD</b>	Duplicaciones internas en tándem del gen FLT3
<b>G-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos (por sus siglas en inglés)
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (por sus siglas en inglés)

<b>GMP</b>	Progenitores de granulocitos-macrófagos bipotentes (por sus siglas en inglés)
<b>HSCs</b>	Células troncales hematopoyéticas (por sus siglas en inglés)
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
<b>IC</b>	Concentración de inhibición (por sus siglas en inglés)
<b>IDH1</b>	Isocitrato deshidrogenasa 1
<b>IDH2</b>	Isocitrato deshidrogenasa 2
<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL-</b>	Interleucina
<b>IMDM</b>	Medio dulbecco modificado por iscove (por sus siglas en inglés)
<b><i>KMT2A-PTD</i></b>	Histona-lisina N-metiltransferasa 2A
<b>LD</b>	Dosis letal (por sus siglas en inglés)
<b>LT-HSCs</b>	Células troncales hematopoyéticas a largo plazo (por sus siglas en inglés)
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de monocitos / macrófagos (por sus siglas en inglés)
<b>MEP</b>	Progenitores de megacariocitos-eritrocitos (por sus siglas en inglés)
<b>MIP</b>	Proteína inflamatoria macrofágica (por sus siglas en inglés)
<b>MNC</b>	Células mononucleadas (por sus siglas en inglés)
<b>MO</b>	Médula ósea
<b>MPAL</b>	Leucemia aguda de fenotipo mixto (por sus siglas en inglés)
<b>MPP</b>	Progenitores multipotentes (por sus siglas en inglés)
<b>MRD</b>	Leucemia residual mínima (por sus siglas en inglés)
<b>MSCs</b>	Células troncales mesenquimales (por sus siglas en inglés)
<b>MVD</b>	Densidad microvascular (por sus siglas en inglés)
<b><i>NPM1</i></b>	Gen nucleofosmina
<b><i>NRAS</i></b>	Oncogen homólogo

<b>PBS</b>	Solución estabilizadora de fosfatos (por sus siglas en inglés)
<b>RC</b>	Remisión completa
<b>rmIL-3</b>	IL-3 recombinante de ratón (por sus siglas en inglés)
<b><i>RUNX1</i></b>	Factor de transcripción runt 1
<b>SCF</b>	Factor de células madre (por sus siglas en inglés)
<b>SCF</b>	Factor de células progenitoras (por sus siglas en inglés)
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SFE</b>	Suero fetal equino
<b>SG</b>	Supervivencia general
<b>ST-HSCs</b>	Células troncales hematopoyéticas a corto plazo (por sus siglas en inglés)
<b><i>TET2</i></b>	Tet metilcitosina deshidrogenasa 2
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante (por sus siglas en inglés)
<b>TLR</b>	Receptor ligando tipo Toll (por sus siglas en inglés)
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés)
<b><i>TP53</i></b>	Gen supresor de tumores p53
<b>Tpo</b>	Trombopoyetina
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial (por sus siglas en inglés)
<b>WHO</b>	Organización mundial de la salud (por sus siglas en inglés)

### 3. RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (AML) es un grupo de enfermedades con diferentes antecedentes biológicos, caracterizada por una transformación maligna de las células hematopoyéticas de linaje mieloide que producen una población anormal. Desde 1970, la combinación de citarabina y una antraciclina ha sido el régimen de inducción estándar para pacientes considerados adecuados para la terapia intensiva de AML con el objetivo de lograr la remisión completa. Pero, se ha informado que estos fármacos contienen efectos hepato- y cardiotoxicos, provocan mielosupresión y síndrome de lisis tumoral (Hwang *et al.*, 2019). Se ha publicado que la caseína y sus componentes inducen la proliferación y diferenciación de la hematopoyesis *in vitro* e *in vivo*, así como su papel en la inducción de apoptosis en líneas de leucemia e incluso induce sobrevida de ratones leucémicos. Recientemente se describió que las combinaciones CS<sub>50</sub>-cita<sub>50</sub> induce una sobrevida del 40% a los 40 días y se mantiene el 10% por más de 70 días, pero no elimina por completo las células auto proliferantes en la MO; finalmente, CS<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> mostró una supervivencia del 85% a los 50 días y el 20% a los 70 días y erradica por completo las células auto proliferantes de MO de ratones con leucemia temprana (Meléndez-Ibarra, 2019). En este trabajo se analiza si las combinaciones CS<sub>50</sub>-cita<sub>50</sub> o CS<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> son efectivas en la erradicación de la leucemia en un modelo de ratón con leucemia avanzada. Los resultados indican que al combinar CS con citarabina o daunorrubicina para tratar a ratones con leucemia avanzada inducidos con la línea celular WEHI-3, el 20% de los ratones tratados con la combinación CS<sub>50</sub>-cita<sub>50</sub> logran sobrevivir antes de los 40 días y el 20% de los ratones tratados con la combinación CS<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> logran sobrevivir incluso después de los 40 días. Ambas combinaciones mantuvieron una buena sobrevida sobre el esquema tradicional cita<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> que mantuvo un 10% de sobrevida a los 40 días como máximo. A los 30 días de tratamiento, la MO de los ratones leucémicos tratados con o sin combinaciones presentan células auto proliferantes y, por tanto, la AML continúa invadiendo la MO. Nuestros resultados demuestran, que el tratamiento CS<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> continúa siendo un tratamiento exitoso, ya que prolonga

la sobrevida de los ratones por sobre el tratamiento convencional "7 + 3" y abre las puertas a una futura alternativa para combatir la AML.

## 4. INTRODUCCIÓN

La AML es un tipo de cáncer que se caracteriza por la infiltración de células clonales del sistema hematopoyético a la médula ósea (MO), a la sangre periférica y a otros tejidos, también, se caracteriza porque estas células proliferan sin control y se diferencian anormalmente. Actualmente la tasa de supervivencia mundial para esta enfermedad es del 35 al 40% en adultos jóvenes  $\leq 60$  años y del 5 al 15% en adultos  $60 \geq$  años (Döhner et al., 2015). La intervención estándar actual para la AML consiste en quimioterapia y trasplante de células troncales. Y si bien, estos tratamientos siguen siendo una terapia estándar para la AML, se ha informado que los fármacos contienen efectos cardiotóxicos, hepatotoxicidad, mielosupresión y síndrome de lisis tumoral (Hwang et al., 2019).

Nuestro grupo de trabajo ha investigado a fondo las propiedades del Caseinato de Sodio (CS) una sal derivada de la caseína y ha demostrado que *in vitro*, inhibe la proliferación de diferentes líneas celulares como WEHI-3, J774, P388 y la hematopoyética normal 32D; Además, sinergiza la proliferación de células mononucleadas de MO normal de ratones en presencia de rmlL-3 como factor de crecimiento (Ramos-Mandujano *et al.*, 2008; Ledesma-Martínez *et al.*, 2013). Administrado en ratones normales induce granulopoyesis (Domínguez-Meléndez *et al.*, 2012); en ratones leucémicos prolonga la supervivencia hasta en un 40%, pero no elimina a las células leucémicas de MO de los ratones sobrevivientes (Córdova-Galaviz *et al.*, 2014; Ledesma-Martínez *et al.*, 2012). Recientemente se mostró que este problema se supera con la combinación del CS con daunorrubicina o citarabina, por tanto, se perfila como una estrategia para curar la enfermedad (Meléndez-Ibarra, 2019), pero desconocemos si lo hace en individuos con leucemia avanzada. Considerando que el diagnóstico de AML generalmente se hace una vez que las manifestaciones son evidentes y que la leucemia está plenamente establecida y por tanto en un estadio avanzado lo que dificulta su tratamiento y cura, el presente trabajo tiene como objetivo mostrar si el CS en combinación con citarabina o daunorrubicina, elimina las células auto proliferantes de la MO de ratón en una leucemia avanzada.

## **5. MARCO TEÓRICO**

### **5.1. HEMATOPOYESIS**

A lo largo de toda su vida, los seres humanos requieren una renovación constante de los tipos celulares que conforman al organismo (Pantoja, *et al.*, 2015). La hematopoyesis es el proceso por el cual los componentes celulares de la sangre se reponen continuamente durante la vida de un individuo (Pinho y Frenette, 2019). Este proceso se mantiene durante toda la vida mediante las Células Troncales Hematopoyéticas (HSCs) de larga vida que son capaces de renovarse y generar todos los tipos de células sanguíneas maduras necesarias (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas) para transportar oxígeno, combatir infecciones y prevenir el sangrado (Mayani, *et al.*, 2007; De La Garza *et al.*, 2017).

#### **5.1.1. ORIGEN DE LA HEMATOPOYESIS**

En los vertebrados, la producción de células madre sanguíneas se logra mediante la asignación y especificación de distintas células embrionarias en una variedad de sitios que cambian durante el desarrollo. En los mamíferos, los sitios secuenciales de hematopoyesis incluyen el saco vitelino, un área que rodea la aorta dorsal denominada Aorta-Gónada-Mesonefros (AGM), el hígado fetal y finalmente la médula ósea (MO). Recientemente la placenta ha sido reconocida como un sitio adicional que participa durante la AGM para el período del hígado fetal (Orkin y Zon, 2008).

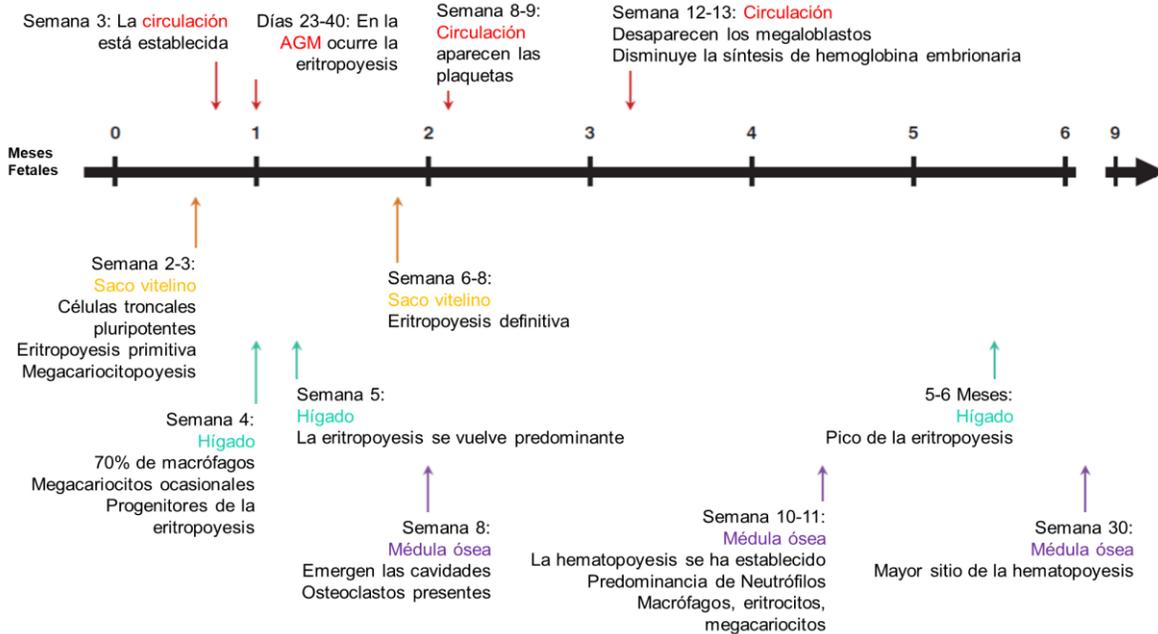


Figura 1. Sitios de cambio de la hematopoyesis durante la gestación humana. La gestación fetal se muestra en meses a través de la flecha central horizontal. El tiempo muestra diferentes eventos de la hematopoyesis, comenzando con la hematopoyesis primitiva y la megacariocitopoyesis en el saco vitelino y terminando con la hematopoyesis definitiva en la MO durante la gestación tardía. Tomado y modificado de Juul y Christensen, 2018

El desarrollo de la sangre en los vertebrados implica dos ondas de hematopoyesis: la onda primitiva y la onda definitiva (Figura 1) (Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013). La onda primitiva, que involucra un progenitor eritroide que da lugar a eritrocitos y macrófagos durante el desarrollo embrionario temprano. El objetivo principal de la onda primitiva es producir glóbulos rojos que puedan facilitar la oxigenación de los tejidos a medida que el embrión experimenta un rápido crecimiento, sin embargo, la onda primitiva es transitoria, y estos progenitores eritroides no son pluripotentes y no tienen la capacidad de renovación (Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013; Orkin y Zon, 2008). La onda definitiva, por el contrario, ocurre más tarde en el desarrollo. En la mayoría de los organismos, hay una ola transitoria de hematopoyesis definitiva que ocurre en los islotes sanguíneos y produce progenitores llamados progenitores eritroides-mieloides (EMPs). La hematopoyesis definitiva más tarde involucra HSCs que son (Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013) monopotentes (Ratajczak *et al.*, 2008) y pueden dar origen a todos los linajes de sangre del organismo adulto (Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013). En los vertebrados, las HSCs definitivas que

se encuentran en la región AGM del embrión en desarrollo, migran al hígado fetal y luego a la MO, que es la ubicación de las HSCs en adultos (Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013; Orkin y Zon, 2008). En los humanos, la hematopoyesis comienza en el saco vitelino y pasa al hígado temporalmente antes de establecer finalmente la hematopoyesis definitiva en la MO y el timo (Jagannathan-Bogdan y Zon, 2013; Orkin y Zon, 2008).

### **5.1.2. CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS**

El proceso de hematopoyesis implica tanto la especificación de linajes de células sanguíneas individuales como la proliferación celular para mantener cantidades adecuadas de células circulantes durante toda la vida, esto es posible gracias a las HSCs (Hatton *et al.*, 2013).

La hematopoyesis es jerárquica, y puede representarse como una serie de ramificaciones en las que las HSCs dan lugar a un progenitor más restringido de linaje, y finalmente a poblaciones celulares diferenciadas en el final (MacLean *et al.*, 2017). En este modelo jerárquico (Figura 2), las HSCs se pueden dividir en dos subpoblaciones de acuerdo con su expresión en HSCs repobladoras a largo plazo (LT-HSCs) y HSCs repobladoras a corto plazo (ST-HSC). Las LT-HSCs son una población rara e inactiva en la MO y tienen una capacidad de reconstitución completa a largo plazo (>3~4 meses), mientras que las ST-HSCs solo tienen una capacidad de reconstrucción a corto plazo (principalmente <1 mes). Las LT-HSC se diferencian en ST-HSCs y, posteriormente, las ST-HSC se diferencian en progenitores multipotentes (MPP), que no tienen la capacidad de autorrenovación detectable. La primera bifurcación ocurre entre: los progenitores mieloides comunes (CMP; con potencial mieloides, eritroides y megacariocítico) y los progenitores linfoides comunes (CLP; con solo potencial linfoides), que se derivan de MPP. El segundo punto de ramificación en las CMP segrega los granulocitos-macrófagos bipotentes (GMP) y los progenitores de megacariocitos-eritrocitos (MEP). Los CLP además forman células T, B, NK y dendríticas, mientras que las GMP se diferencian en granulocitos/monocitos y los MEP generan megacariocitos/eritrocitos. Todas estas poblaciones forman un modelo jerárquico equilibrado en forma de árbol,

dentro del cual los factores clave de transcripción y las citocinas conducen con precisión la diferenciación gradual de HSCs a células sanguíneas maduras (Cheng *et al.*, 2019).

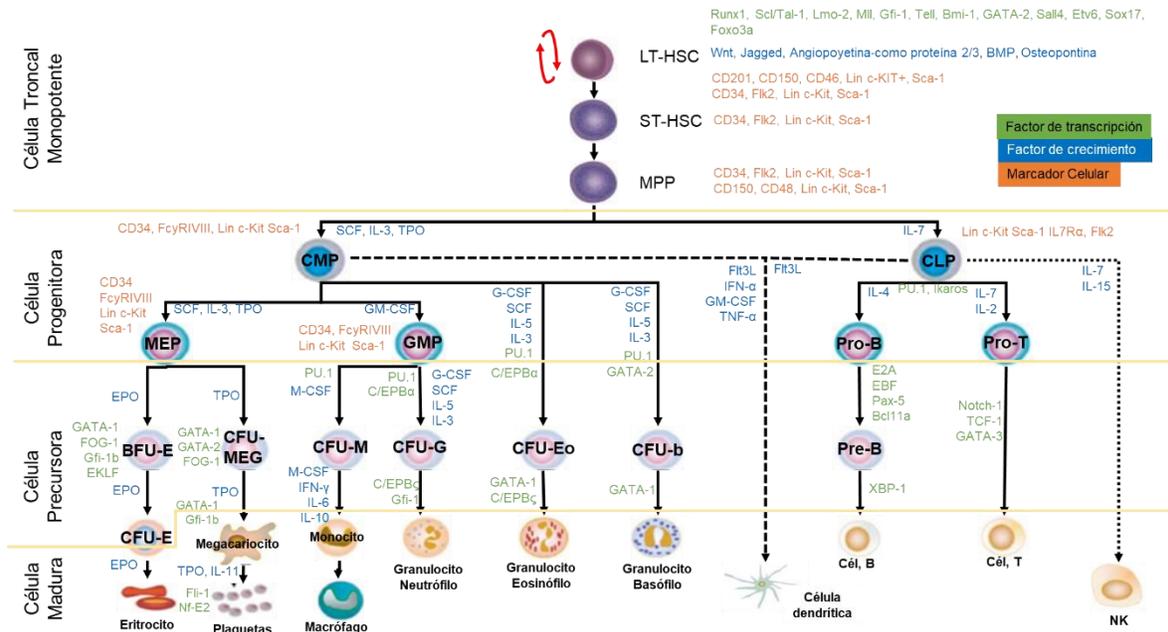


Figura 2. Cascada hematopoyética junto con sus principales factores de transcripción, de crecimiento y marcadores celulares. LT-HSCs: células madre hematopoyéticas repobladoras a largo plazo; ST-HSCs: células madre hematopoyéticas repobladoras a corto plazo; MPP: progenitoras multipotenciales; CMP: progenitor mieloide común; CLP: progenitor linfoide común; MEP: progenitor megacariocito-eritroide; GMP: progenitor mieloide granulocítico; CFU: unidad formadora de colonias; BFU: unidad de formación de blastos; Epo: eritropoyetina; Tpo: trombopoyetina; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; MCSF: factor estimulante de colonias de monocitos / macrófagos; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; TNF: factor de necrosis tumoral; SCF: factor de células madre; IL: interleucina. Tomado y modificado de Larsson y Karlsson, 2005; Orkin y Zon, 2008; Kasper *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2019; Sieff *et al.*, 2019.

La sangre humana contiene varios tipos de células diferentes con funciones específicas. Los eritrocitos, también conocidos como glóbulos rojos (RBCs) transportan oxígeno desde los pulmones a los tejidos y eliminan el dióxido de carbono. Los leucocitos, también conocidos como glóbulos blancos (WBCs) están involucrados en la reacción inflamatoria y la respuesta inmune. Los glóbulos blancos comprenden: granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos y mastocitos), linfocitos (células T, células B y células asesinas naturales o "Natural Killers"), monocitos/macrófagos y células dendríticas. Las plaquetas son fragmentos

celulares derivadas de megacariocitos y juegan un papel esencial en el mantenimiento de la hemostasia (Antoniani *et al.*, 2017). Ver tabla 1.

**Tabla 1: Principales funciones de las células sanguíneas.**

<b>Tipo de célula</b>	<b>Principales funciones</b>
Eritrocitos (glóbulos rojos)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transporte de O<sub>2</sub> desde los pulmones hasta los tejidos</li> </ul>
Granulocitos neutrófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quimiotaxia, fagocitosis, destrucción de bacterias fagocitadas</li> </ul>
Granulocitos eosinófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todas las funciones de los neutrófilos enumeradas antes, células efectoras para daño dependiente de anticuerpos por parásitos metazoarios, regulación de reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato (Neutraliza la histamina por la histaminasa y leucotrienos liberados por basófilos y mastocitos)</li> </ul>
Granulocitos basófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipersensibilidad de tipo inmediato mediada (los basófilos cubiertos de IgE reaccionan con antígeno específico y liberan histamina y leucotrienos), modulación de reacciones inflamatorias mediante la liberación de heparina y proteasas</li> </ul>
Monocitos y macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quimiotaxia, fagocitosis, destrucción de algunos microorganismos, presentación de antígeno, liberación de IL-1 y TNF que estimulan las células del estroma de la MO para producir GM-CSF, M-CSF e IL-6</li> </ul>
Plaquetas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhesión a tejido conectivo subendotelial, participa en la hemostasia</li> </ul>
Linfocitos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fundamentales para las reacciones inmunitarias y la producción de factores de crecimiento hematopoyéticos</li> </ul>

*Tomado de Hatton et al., 2013*

### 5.1.3. MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO

Para desarrollarse y diferenciarse, las HSCs requieren soporte del factor de crecimiento celular y soluble. Los elementos celulares son proporcionados por el hueso circundante, el estroma de la MO y el microambiente (Sieff *et al.*, 2019).

### ARQUITECTURA DE LA MÉDULA ÓSEA

Para comprender cómo interactúan las HSCs y los reguladores del microambiente, es necesario conocer la organización micro anatómica y las propiedades de la MO (Figura 3). La MO es un órgano complejo que abarca varios tipos de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas que están interconectadas por una red

vascular e inervada dentro de las cavidades de los huesos largos y los huesos axiales (que incluye el cráneo, el esternón, las costillas, las vértebras e ilion) que son el principal sitio hematopoyético. La médula hematopoyética (roja) de los huesos largos humanos se reemplaza progresivamente en la adolescencia por la médula amarilla “grasa” que tiene una actividad hematopoyética insignificante, excepto en las regiones proximales de los huesos largos (Pinho y Frenette, 2019).

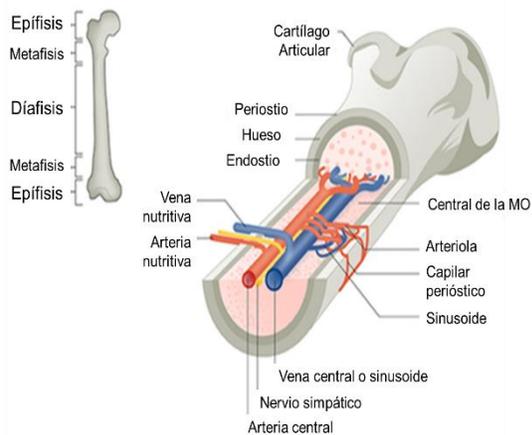


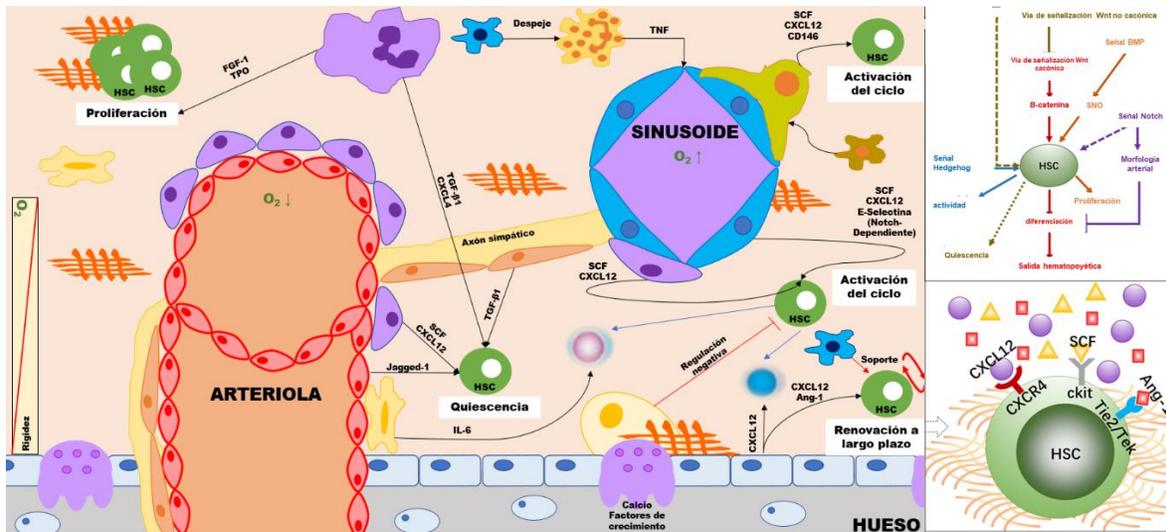
Figura 3. La MO es el sitio primario de mantenimiento de HSCs y hematopoyesis. Vista longitudinal de un fémur que ilustra la disposición de los vasos sanguíneos y los nervios que acompañan a las arterias dentro de la cavidad de la MO. La capa perióstica cubre la superficie externa del hueso y la capa del endostio está en la interfaz del hueso y la MO. Las arterias ramificadas corren paralelas al eje largo de la cavidad medular, a menudo cerca del endostio. Estos vasos se alimentan en la red sinusoidal que se distribuye uniformemente por toda la cavidad de la médula y luego se une para formar la circulación venosa. Tomado y modificado de Pinho y Frenette, 2019.

#### 5.1.4. NICHOS HEMATOPOYÉTICOS: UNIDADES QUE FORMAN PARTE DEL MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO

El sistema hematopoyético se desarrolla junto con la formación ósea. Los nichos de las células progenitoras hematopoyéticas es el microambiente esencial donde residen células progenitoras e integran varios estímulos para determinar su destino y proporcionan un soporte especial para la viabilidad celular (Zhang *et al.*, 2019). El término “nicho” utilizado para el microambiente específico de la MO fue acuñado por primera vez por Schofield en 1978, en donde observó que el crecimiento de HSCs no fue soportado en el bazo de la misma manera que en la MO. También propuso que las HSCs estén en contacto íntimo con el hueso, y que el contacto célula-célula es responsable de la capacidad proliferativa aparentemente ilimitada y la inhibición de la maduración de las HSCs (Bydlowski *et al.*, 2013). En pocas palabras, los nichos de HSCs se refieren comúnmente al emparejamiento de poblaciones de

células hematopoyéticas y mesenquimales que regulan la autorrenovación, diferenciación y proliferación de HSCs (Boulais y Frenette, 2015).

Los nichos se alojan en compartimentos especializados en la MO, que pueden ser de dos tipos: (1) el nicho endosteal (-nicho óseo-, próximo al hueso. Donde los osteoblastos derivados de precursores mesenquimales se localizan en las regiones endosteales) y (2) el nicho perivascular (-nicho vascular- Este nicho alberga HSCs muy cerca de los osteoblastos y de las células endoteliales (Zhang *et al.*, 2019); La función de este nicho podría estar involucrado en el mantenimiento de las HSCs dentro de la MO (Bydlowski *et al.*, 2013)). Estos nichos también se conocen como arteriolares (endosteal) y sinusoidales (perivascular) respectivamente (Zhang *et al.*, 2019) (Bydlowski *et al.*, 2013; Salmen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019). Los nichos proporcionan un microambiente para el contacto celular y las funciones secretoras de las células de osteoblásticas, osteoclastos, células endoteliales sinusoidales, macrófagos, células troncales mesenquimales (MSCs) que incluyen células CAR, neuronas simpáticas y la matriz extracelular (Sieff *et al.*, 2019). Ambos nichos actúan juntos para mantener la homeostasis hematopoyética o restaurarla después del daño (Figura 4). La principal diferencia entre ambos microambientes en el nivel de oxígeno: más alto en el nicho vascular que en el nicho óseo (Bydlowski *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2020). Se sabe que el microambiente bajo en oxígeno (hipoxia) no solo es tolerado por las HSCs, sino que también es esencial para mantener su potencia (Zhang & Sadek, 2014) pues se ejerce un papel protector al promover un cambio metabólico hacia la glucólisis anaeróbica que salvaguardaría a las células troncales del estrés oxidativo, minimizando así el daño del ADN que podría transmitirse potencialmente a la progenie madura, de este modo, mantiene en quiescencia a las HSCs (Nombela-Arrieta & Siberstein, 2014).



	<b>Osteocito</b>		<b>Célula no mielinizada de Schwann GFAP+</b>		<b>Progenitor mieloide</b>
	<b>Osteoblasto</b>		<b>Célula estromal perivascular</b>		<b>Progenitor linfoides</b>
	<b>Osteoclasto</b>		<b>Pericito arteriolar MYH11<sup>+</sup> o NG2<sup>+</sup> (Nestin-GFP<sup>hi</sup>)</b>		<b>Megacariocito</b>
	<b>Célula troncal mesenquimal</b>		<b>Célula CAR LepR<sup>+</sup> (Nestin-GFP<sup>Lo</sup>)</b>		<b>Neutrófilo</b>
	<b>Célula Endotelial Arteriolar</b>		<b>Macrofago CD169<sup>+</sup></b>		<b>Macrófagos</b>
	<b>Célula Endotelial Sinusoidal</b>		<b>Matriz extracelular</b>		<b>Adipocito</b>

Figura 4. El modelo logístico de los nichos endosteal y perivascular en la MO. Los nichos regulan la inactividad, autorrenovación, movilización y diferenciación de HSC. Múltiples factores como el contacto célula-célula, las citocinas secretadas, las señales, Los factores de la matriz extracelular (fibronectina, ácido hialurónico, colágeno, laminina, glicosaminoglicanos, heparán sulfato y condroitín sulfato) y el gradiente de concentración de oxígeno; regulan directa o indirectamente en las HSCs. Los nervios del sistema nerviosos simpático (SNS) regulan la movilización de HSCs y las células de Schwann no mielinizantes pueden contribuir a la quiescencia de HSCs. Los osteoblastos se han implicado en la regulación de HSCs, pero las señales moleculares precisas no se han aclarado; sin embargo, pueden tener un papel en la regulación de los progenitores linfoides. Los adipocitos pueden afectar negativamente el mantenimiento de HSCs. Células hematopoyéticas, como macrófagos, neutrófilos, células T reguladoras y megacariocitos, son ejemplos de progenie derivada de las HSCs que pueden retroalimentar y contribuir al mantenimiento o movilización de las HSCs, Tomado y modificado de Pinho y Frenette, 2019; Siefert *et al.*, 2019; Zhang, *et al.*, 2019. Figura tomada y modificada de Zhang *et al.*, 2019.

## **NICHO ENDOSTEAL**

El nicho endosteal, localizado en la superficie interna de la cavidad ósea y con abundantes osteoblastos, puede servir como reservorio para el almacenamiento de las HSCs a largo plazo en estado inactivo. Estudios realizados en los 70's indicaron que las células hematopoyéticas indiferenciadas se localizan cerca de la superficie del hueso endosteal, y que las células diferenciadas se mueven hacia el eje central de la médula. El nicho endosteal presenta plasticidad y está bajo una regulación propia y sistémica (Bydlowski *et al.*, 2013). El nicho endosteal está compuesto de:

## **CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS**

Los osteoblastos son responsables de la producción de la matriz, que secretan en el sitio del hueso, así como de la mineralización ósea. Finalmente, los osteoblastos se rodean de matriz y terminan como osteocitos o se convierten en células que recubren los huesos, que es un proceso reversible. Las células osteoblásticas formadoras de hueso son jugadores cruciales para la homeostasis del tejido hematopoyético por su alto recambio. La proliferación y diferenciación de las HSCs está regulada por una amplia variedad de citocinas, factores de crecimiento y otras moléculas de señalización. Estas células sintetizan una serie de moléculas de señalización celular que parecen contribuir al mantenimiento y la regulación de las HSCs (Bydlowski *et al.*, 2013). Ver tabla 2.

**Tabla 2. Factores que regulan el mantenimiento del nicho endosteal.**

	<b>Función</b>
Jagged	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ligando para receptor Notch.</li> <li>-Encargado de controlar la diferenciación y mejorar la capacidad de autorrenovación de HSCs durante condiciones de estrés.</li> </ul>
Trombopoyetina (TPO) y Angiopoyetina (Ang-1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Se unen a receptores MPL y Tie2 respectivamente.</li> <li>-Encargados de la activación de integrina <math>\beta 1</math> y la N-cadherina.</li> <li>-Aumenta la quiescencia y mantiene la capacidad de repoblación a largo plazo de las HSCs.</li> <li>-Protegen de apoptosis al activar la vía PI3K.</li> </ul>
Osteopontina	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Glicoproteína expresada por osteoblastos.</li> <li>-Apoya la adhesión de HSCs al nicho osteoblástico y regula negativamente la proliferación de HSCs, contribuyendo a un estado inactivo.</li> </ul>
Factor derivado del estroma-1 (SDF-1), también llamado ligando CXC-12 (CXCL-12)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Funciona como quimio-atrayente para los progenitores hematopoyéticos comprometidos y primitivos.</li> <li>-Contrarresta con su receptor afín CXCR4. La señalización SDF-1/CXCR4 regula la linfopoyesis de células B, la mielopoyesis en la MO y la formación del tabique ventricular cardíaco.</li> <li>-Media el reclutamiento de células progenitoras endoteliales (EPC) de la MO a través de un proceso dependiente de CXCR4 que sugiere el papel funcional en la vasculogénesis en la que las EPCs podrían formar vasos sanguíneos.</li> </ul>
N-cadherina	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Aumenta la adherencia de HSCs en la superficie endosteal.</li> <li>-Se asocia con la inactividad de las HSCs y la diferenciación disminuida.</li> </ul>
Factor de células progenitoras (SCF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Factor de crecimiento secretado por osteoblastos.</li> <li>-regula la actividad de HSCs <i>in vivo</i> y autorrenovación <i>in vitro</i>.</li> <li>-Las HSCs expresan un receptor de tirosina quinasa transmembranal llamado receptor de factor de células progenitoras (c-Kit), que se une a SCF, activando la señalización intracelular importante para la regulación de HSCs.</li> </ul>

Familia Wingless (WNT)

-Desempeñan un papel en la autorrenovación de HSCs.  
-Importante en la formación del hueso y agrandamiento de superficie endosteal.

*Tomado y modificado de Bydlowski et al., 2013; Boulais y Frenette, 2015*

## **CÉLULAS ENDOTELIALES**

Se propuso que las células endoteliales fueran importantes en el microambiente de las HSCs *in vivo*, se localizan a estas células junto a las HSCs. Estas células expresan moléculas de adhesión como la E-selectina y secretan factores solubles que pueden expandir las células hematopoyéticas primitivas humanas *ex vivo* mediante la producción del ligando Notch, sin embargo, no se ha comprobado que las células endoteliales sean un componente regulador necesario del microambiente *in vivo* (Bydlowski *et al.*, 2013; Sieff *et al.*, 2019).

## **CÉLULAS OSTEOCLÁSTICAS**

Estas células se forman por fusión de múltiples células progenitoras de granulocitos-macrófagos, en un proceso mediado por los osteoblastos. En este proceso, se reabsorbe la matriz extracelular mineralizada formada por los condrocitos u osteoblastos ubicados en el nicho endosteal (Kollet *et al.*, 2006). Se ha informado que los osteoclastos degradan los componentes del nicho endosteal y mejoran la movilización de las células progenitoras hematopoyéticas. Las enzimas secretadas por los osteoclastos son responsables de la liberación de HSCs del nicho endosteal. Estas enzimas pueden escindir factores que promueven la interacción entre HSCs y su nicho. También pueden promover el alojamiento de HSCs en el nicho endosteal (Bydlowski *et al.*, 2013).

## NICHO VASCULAR

La hematopoyesis y la vascularización ocurren simultáneamente durante el desarrollo. De hecho, las HSCs y las células endoteliales se derivan de las mismas células progenitoras (denominadas hemangioblastos) en la etapa embrionaria y están estrechamente relacionadas con la ontogenia de la hematopoyesis (Yin y Li, 2006). El nicho vascular promueve la proliferación, diferenciación, activación del ciclo celular y las ST-HSCs. Así mismo, las células endoteliales en el nicho de ambiente vascular que entran en contacto con las HSCs proporcionan señales de mantenimiento sobre el comportamiento de las HSCs. Sin embargo, es esencial tener en cuenta que la vasculatura no está compartimentada en la región central de la MO y, de hecho, la región endosteal del hueso también está vascularizada. Por lo tanto, los osteoblastos y nichos vasculares propuestos dentro de la médula no son completamente separables y funcionan de manera interdependiente para generar y mantener a las HSCs. Se ha demostrado que el nicho vascular produce factores importantes para la movilización, *homing* y el injerto de HSCs. Dos grupos de células perivasculares que poseen propiedades de células mesenquimales funcionan como células de nicho: El ligando de quimiocina CXC-12 (CXCL-12), las células reticulares abundantes (CAR) y las células progenitoras mesenquimales Nestin 234+ (Bydlowski *et al.*, 2013). Ver tabla 3.

**Tabla 3. Células participantes del nicho perivascular.**

Células CAR	Células NES+
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Constituyen la capa subendotelial (adventicia) de paredes sinusoidales</li> <li>• Altas secretoras de SDF-1 (CXCL-12), también se les llama células reticulares abundantes (CAR)</li> <li>• Expresan VCAM-1, CD44, PDGFR<math>\alpha</math> y PDGFR<math>\beta</math>, poseen alta diferenciación adipogénica y osteogénica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína de filamento intermedio</li> <li>• Alta tasa de diferenciación en adipocitos, osteoblastos y condrocitos</li> <li>• Su función reguladora de HSCs se modifica por simpatectomía o con G-CSF (que regula negativamente la capacidad de las HSCs de expresar CXCL12, SCF, angipoyetina, IL-7 y VCAM1)</li> <li>• Estas células expresan altos niveles de genes involucrados en la regulación de HSCs como; CXCL12, c-Kit, angiopoyetina-1, IL-7, VCAM1 y osteopontina)</li> </ul>

*Tomado y modificado de Bydlowski et al., 2013; Boulais y Frenette, 2015*

### 5.1.5. REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

Para mantener su integridad funcional de por vida, las HSCs están estrictamente reguladas tanto de manera intrínseca a la célula (factores de transcripción), como por señales extrínsecas (interacciones célula-célula, interacciones célula-matriz extracelular y factores de crecimiento solubles) del microambiente de la MO (Larsson y Karlsson, 2005; Olson *et al.*, 2020). Estas alteraciones de señales internas o externas pueden promover o antagonizar la proliferación (autorrenovación), la inactividad, la diferenciación, la migración, la apoptosis o la transformación maligna (Larsson y Karlsson, 2005). Sin embargo, la sobreproducción de factores de crecimiento es una característica común de las células tumorales, estimulando la proliferación no regulada de sí mismas de manera autocrina y de las células adyacentes de manera paracrina (Ekmekcioglu *et al.*, 2008).

Un factor de crecimiento hematopoyético es un término común para la familia de glicoproteínas que regulan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Las citocinas son un subtipo de factores de crecimiento que son producidos por los tipos de células hematopoyéticas e inmunes que incluyen interferones (IFN) e interleucinas (IL). Una citocina es una proteína mensajera química que transporta una señal bioquímica entre las células, generalmente del sistema inmunitario y al resto del cuerpo. La IL designa cualquier proteína soluble o producto de glicoproteína de los leucocitos que regula la respuesta de otros leucocitos. La naturaleza pleiotrópica de muchas citocinas e IL permite influir en prácticamente todos los sistemas de órganos (Ekmekcioglu *et al.*, 2008). A continuación, en la tabla 4, se enlistan los principales factores de crecimiento hematopoyético.

Aunque se haya negado la existencia de citocinas supresoras y se haya argumentado que la hematopoyesis estaría regulada exclusivamente por estímulos positivos, siendo el estímulo negativo en realidad la ausencia de está estimulación positiva (Fernández-Delgado *et al.*, 1992), se sabe desde hace décadas que las citocinas proinflamatorias como la Interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral-

alfa (TNF- $\alpha$ ), los IFN, receptores ligando tipo Toll (TLR) (Schuettpelez y Link, 2013) y otras señales de peligro como: patógenas o de daño, asociadas a patrones moleculares; incrementan, o en algunos casos, suprimen la producción normal de células normales de MO (Pietras, 2017). En particular, se ha demostrado que estimulan la proliferación, diferenciación y la capacidad de repoblación de HSCs (Figura 5) y se sugiere que dicha “señalización inflamatoria” también contribuye a esta regulación de HSCs en condiciones homeostáticas (es decir, en ausencia de infección o daño tisular). Si bien, esta señalización inflamatoria puede ser ventajosa a corto plazo, existen pruebas de que la inflamación crónica puede ser perjudicial, pues puede contribuir a la insuficiencia en la MO y la transformación maligna en humanos (Schuettpelez y Link, 2013). Todo esto es necesario para mantener el microambiente hematopoyético y una homeostasis inmune que tienen como finalidad ser un agente inmunomodulador, para combatir la fisiología de las células troncales leucémicas (Camacho et al., 2017). En la tabla 5 se describen algunos de estos factores.

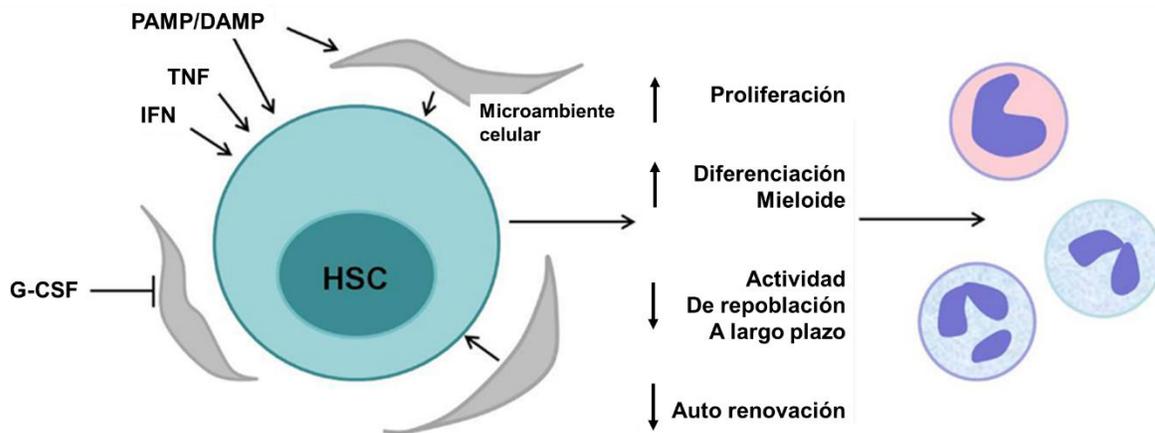


Figura 5. Regulación de HSCs por mediadores inflamatorios. Múltiples citocinas y ligandos asociados a patógenos regulan las HSCs: TNF, IFN, citocinas movilizadoras como G-CSF y varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP/DAMP) que actúan directamente a través de sus receptores afines sobre las HSCs o indirectamente sobre las células del estroma en el nicho de las células madre para afectar a las HSC. La señalización a corto plazo induce la proliferación de HSCs y diferenciación mieloide suministrando células efectoras de la respuesta inmune innata. Sin embargo, la exposición sostenida a estas señales reduce la actividad de repoblación a largo plazo de las HSCs, su autorrenovación y puede contribuir a la insuficiencia y malignidad de la MO. Tomado de Schuettpelez y Link, 2013.

**Tabla 4. Receptores, antagonistas naturales, localización cromosómica y acción biológica de los factores de crecimiento y citocinas.**

FACTOR DE CRECIMIENTO O CITOCINA	RECEPTOR	ANTAGONISTA NATURAL	LOCALIZACIÓN EN EL CROMOSOMA	ACCIÓN BIOLÓGICA
<b>Eritropoyetina (EPO)<sup>1</sup></b>	Receptor EPO	Es afín al receptor EPO	7q21	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de precursores eritroides</li> </ul>
<b>GM-CSF<sup>1</sup></b>	Receptor tipo 1 con subunidades $\alpha$ y $\beta$		5q31.1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula el crecimiento y el multilineaje de las colonias progenitoras como: BFU-E, granulocitos, macrófagos y eosinófilos</li> <li>• Induce a la migración y proliferación de células endoteliales vasculares</li> <li>• Activa a fagocitos maduros (neutrófilos, macrófagos y eosinófilos)</li> </ul>
<b>G-CSF<sup>1</sup></b>	Receptor G-CSF		17q11.2-q12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regula la producción y funcionamiento de los neutrófilos</li> <li>• En niveles altos da como resultado una función alterada de HSCs en la MO a través de alteraciones en el microambiente de la MO y posiblemente a través de la señalización directa de G-CSF en HSCs</li> </ul>
<b>M-CSF<sup>1</sup></b>	Fms		1p21-p13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Influencia en muchos aspectos de desarrollo y función de los monocitos/macrófagos</li> <li>• Estimula la hematopoyesis</li> <li>• Induce la producción de osteoclastos</li> </ul>

**SCF<sup>1</sup>**

c-kit

Es afín al receptor c-Kit

12q22-12q24

- Promueve la hematopoyesis a diferentes niveles
- Influencia en las células germinales primordiales y la migración de melanocitos durante la vida del embrión
- Afecta la inmunoregularidad de células como: células B o T, mastocitos, NK y células dendríticas
- Influencia en las propiedades de adhesión de células hematopoyéticas

**Trombopoyetina (TPO)<sup>1</sup>**

Mp1

3q27-q28

- Mejor regulador de producción de plaquetas
- Actúa en sinergia con EPO para estimular el crecimiento de progenitores eritroides
- Actúa en sinergia con IL-3 y SCF para estimular la proliferación y prolongar la supervivencia de las HSCs.

**IL-1<sup>1</sup>**

IL-1RI e IR-1RII: Una extensa familia de 10 miembros que incluyen IL-18R

Es afín a los receptores IL-1RI, IL-1RII E IL-1RA

2q13

- Induce la proliferación de múltiples citocinas
- Regula la expresión de marcadores de superficie para citocinas
- Sinergia con otras citocinas para estimular la proliferación de progenitores hematopoyéticos
- Influye en la regulación de células inmunes (repuesta de células T y B)
- Modula la función endócrina
- Afecta la formación del hueso

- IL-1 R actúa como un cofactor de transmisión neural. IL-1 es probablemente no crítico para la hematopoyesis normal, pero si central en estados de enfermedad.

<b>IL-2<sup>1</sup></b>	Complejo heterotrimérico $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$	4q26-q27	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induce la proliferación y activación de células T, células B y NK</li> </ul>
<b>IL-3<sup>1</sup></b>	Receptor IL-3 (heterodímero de IL-3 específico para la subunidad alfa o subunidad $\beta$ )	5q31	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimula a progenitores hematopoyéticos en multilínea, especialmente cuando se usa en combinación con otras citocinas como: SCF, IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF, EPO y TPO</li> </ul>
<b>IL-4<sup>1</sup> e IL-13<sup>1</sup></b>	<p>Los receptores IL-4 e IL-13 Comparten subunidades. El receptor de IL-4 tipo I (IL-4R <math>\alpha</math> y el receptor IL-2 con cadenas de subunidades <math>\gamma</math>c) transduce a la IL-4 y al receptor de IL-4 tipo II (IL-4R<math>\alpha</math> y la subunidad de</p> <p>Es afín a los receptores existentes de IL-4 e IL-13</p>	5q31	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ambos están involucrados en una reacción alérgica (induce un cambio en IgE)</li> </ul>

IL-13R $\alpha$ 1)  
transduce a IL-4  
e IL-13; IL-4 $\alpha$  y  
el complejo de  
IL-13R $\alpha$ 2 o IL-  
13R $\alpha$ 1  
transduce a IL-  
13

**IL-5<sup>1</sup>**

Consiste en  
subunidades de  
IL-5R $\alpha$  (IL-5  
específico) y  $\beta$ .  
La subunidad  $\beta$   
es común en los  
complejos de  
IL-3 y GM-CSF

5q31

- Regula la producción función, supervivencia y migración de eosinófilos
- Mejora el número y la función de los basófilos

**IL-6<sup>1</sup>**

IL-6R $\alpha$  junto  
con gp130

7p21

- Desarrollo y función de células B y T
- Trombopoyesis
- Síntesis de proteínas en fase aguda
- Inhibe la excreción de albumina hepática
- Resorción ósea de los osteoclastos
- Diferenciación neutral

**IL-7<sup>1</sup>**

Compuesto de  
IL-7R $\alpha$ (CD127)  
y las  
subunidades  $\gamma$ c

8q12-q13

- Desarrollo crítico para las células B y T

<b>IL-8<sup>1</sup></b>	IL-8R $\alpha$ e IL-8R $\beta$	4q12-q13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potente agente quimio atrayente para una variedad de leucocitos, especialmente neutrófilos</li> <li>• Suprime la formación de colonias de progenitores mieloides inmaduros</li> <li>• Incrementa la proliferación celular de queratinocitos y células endoteliales</li> <li>• Incrementa la adhesividad de células de melanoma</li> </ul>
<b>IL-9<sup>1</sup></b>	Receptor de IL-9	5q31.1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soporta una maduración clono génica de progenitores eritroides</li> <li>• Actúa como factor de diferenciación de mastocitos</li> <li>• Protege de apoptosis y linfomas</li> <li>• Coopera con la IL-4 en la respuesta de las células B</li> <li>• Mejora la diferenciación neuronal</li> </ul>
<b>IL-10<sup>1</sup></b>	Receptor IL-10 y receptores de interferón	1q31-q32	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibe la síntesis de citocinas por Th1 y para monocitos/macrófagos</li> <li>• Estimula la proliferación de células B</li> <li>• Involucrado en la transformación de células B por el virus Epstein-Barr y para receptores de factor de necrosis tumoral (TNF)</li> </ul>
<b>IL-11<sup>1</sup></b>	IL-11R $\alpha$ y gp130 con su subunidad	19q13.3-q13.4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conocido como un factor trombopoyético</li> <li>• Estimula progenitores como: eritropoyesis, mielopoesis y linfopoyesis</li> <li>• Estimula el desarrollo de osteoclastos</li> </ul>

gp130=CD130  
 en 5q11  
 IL6-,  
 oncostatina M y  
 el factor  
 inhibitorio de  
 leucemia usa  
 subunidades de  
 gp130

- Inhibe la adipogénesis
- Estimula la proliferación de células neuronales

<b>IL-12<sup>1</sup></b>	Cadenas de IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 relacionados con gp130	Homo dímeros IL-12 p40	IL-12A:3p12-q13.2 IL-12B:5q31.3-q33.1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citocina proinflamatoria importante para resistir infecciones</li> <li>• Desarrolla Th1</li> <li>• Estimulador e inhibidor de la hematopoyesis</li> </ul>
<b>IL-14 o TXLNA<sup>2,3,4</sup></b>	Solo las células B poseen receptores para está interleucina (IL14R)		1p35.2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta la proliferación de células B</li> <li>• Inhibe la síntesis de anticuerpos</li> </ul>
<b>IL-15<sup>1</sup></b>	Alta afinidad a receptores de IL-2R con cadenas $\beta$ y $\gamma$ y a la cadena de IL-15R $\alpha$		4q31	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dispara la producción y proliferación de inmunoglobulinas en células B pre activadas</li> <li>• Controla el número y memoria de Células T CD8+ en balance de IL-15 (estimulador) y de IL-12 (inhibidor)</li> <li>• Estimula la proliferación de NK y activa células T CD4+ o CD8+</li> </ul>

				<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilita la inducción de células LAK y CTLs</li> <li>• Estimula la producción de mastocitos</li> <li>• Promueve la proliferación de células leucémicas</li> </ul>
<b>1L-16<sup>1</sup></b>	Requiere CD4 para actividades biológicas		15q26.1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quimio atrayente para células CD4+ (Células T monocitos y eosinófilos)</li> </ul>
<b>IL-17<sup>1</sup></b>	Receptor de IL-17		2q31	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede mediar en parte la inflamación de células T</li> <li>• Estimula a la expresión de una variedad de citocinas inflamatorias de células epiteliales, endoteliales, fibroblásticas y macrófagos</li> <li>• Promueve la capacidad de crecimiento de progenitores hematopoyéticos</li> <li>• Promueve la diferenciación de progenitores de células dendríticas</li> </ul>
<b>IL-18<sup>1</sup></b>	Receptor de IL-18	Existe la proteína de unión de IL-18	11q22.2-q22.3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promueve la producción de IFN-<math>\gamma</math> y TNF</li> <li>• Sus objetivos son las células T, NK y macrófagos</li> <li>• Promueve Th1 en respuesta a virus</li> </ul>
<b>IL-19<sup>1</sup></b>	IL-20R1 e IL-20R2		1q32	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induce IL-6 y TNF-<math>\alpha</math></li> </ul>

<b>IL-20<sup>1</sup></b>	IL-20R1 e IL-20R2	1q32	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induce a genes involucrados en la inflamación como TNF-<math>\alpha</math>, MRP14 y MCP-1</li> </ul>
<b>IL-21<sup>1</sup></b>	Receptor de IL-21	4q26-27	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regula la proliferación y diferenciación de células T</li> <li>• Regula y medía a células inmunitarias y al despeje de células tumorales</li> </ul>
<b>IL-22<sup>1</sup></b>	IL-22R1 e IL-10R2	12q14	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regula la producción de reactantes en fase aguda</li> <li>• Induce la producción de ROS cuando las células B descansan</li> </ul>
<b>IL-23<sup>1</sup></b>	IL-12RB1 e IL-23R	12q13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La única función de la IL-23 es la inducción preferencial y proliferación de la memoria sub conjunta de células T</li> </ul>
<b>IL-24<sup>1</sup></b>	IL-20R1 e IL-20R2 IL-22R1 e IL-20R2	1q32	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induce IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-12 y GM-CSF</li> <li>• Funcionalmente tiene efectos contrarios a la IL-10</li> <li>• Infección con Ad-IL24 resultan en una regulación negativa de Bcl-2 Y Bcl-XL (proteínas anti apoptóticas) y una regulación positiva en Bax y Bak (proteínas pro apoptóticas) en células de cáncer</li> </ul>
<b>IL-25<sup>1</sup></b>	IL-17BR	14q11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induce la expresión de genes y producción proteica de IL-4, IL-5 e IL-13</li> </ul>

<b>IL-26<sup>1</sup></b>	IL-20R1 e IL-10R2	12q14	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiene un rol inmuno protector contra infecciones virales</li> </ul>
<b>IL-27<sup>1</sup></b>	TCCR/WSX-1 y GP130	12q13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inicia Th1</li> <li>• Sinergia con IL-12 e induce IFN-<math>\gamma</math> para producir células T y NK</li> </ul>
<b>IL-28A, IL-28B e IL-29<sup>1</sup></b>	IL-28R1 e IL-10R2	19q13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activos antivirales</li> </ul>
<b>IL30<sup>2,5</sup></b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subunidad de heterodímero de IL-27</li> <li>• Igual de funcional que la IL-27</li> <li>• Actúa sobre monocitos, macrófagos, células dendríticas, células T y B, NK y células endoteliales.</li> </ul>
<b>IL-31<sup>1</sup></b>	Receptor de IL-31 y receptor oncostatina M	12q24	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Responsable de promover las respuestas dérmicas y epiteliales que caracterizan enfermedades alérgicas o no alérgicas</li> </ul>
<b>IL-32<sup>1</sup></b>	Proteinada 3	16p13.3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Induce citocinas proinflamatorias y quimiocinas como TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-6 e IL-8</li> <li>• Induce la degradación de IKB</li> <li>• fosforila p38 en la señalización de MAPK</li> </ul>

<b>IL-33<sup>1</sup></b>	ST2		9p24.1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activa NF-KB y MAP quinasas</li> <li>• Conductor en la producción de Th2</li> <li>• Induce la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13</li> </ul>
<b>IL-34<sup>2, 3, 5</sup></b>	CSF1R		16q22.1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promueve el crecimiento y desarrollo de células mieloides</li> <li>• Mejora la producción de IL-6</li> </ul>
<b>IL-35<sup>1</sup></b>	IL-12R $\beta$ 2 gp130	y	3 E 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contribuye en la actividad supresora de Treg</li> <li>• Induce a los niveles de suero de IL-12 e IFN-<math>\gamma</math></li> <li>• Reduce la inducción de IL-17</li> </ul>
<b>IL-36<sup>1</sup></b>	IL-1Rrp2 e IL-1RAcP		IL36 $\alpha$ : 2q12-q14.1 IL36 $\beta$ :2q14 IL36 $\gamma$ : 2q12-q21 IL36RN: 2q14	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activa NFKB y MAP quinasas</li> <li>• Juega un rol importante en la biología de la piel</li> <li>• Involucrado en la iniciación y regulación de respuestas inmunes</li> </ul>
<b>IL-37<sup>1</sup></b>	IL-18R		2q12-q14.1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regula la respuesta inmune</li> </ul>
<b>IL-38<sup>1</sup></b>	IL-36R		2q13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce la producción de IL-36<math>\gamma</math> e induce IL-8</li> </ul>
<b>IL-39<sup>2, 5, 6, 7</sup></b>	IL-23R y gp130		12q13.3 (P19); 19p13.3 (EBI3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actúa sobre los neutrófilos induciendo su diferenciación o expansión</li> </ul>

**IL-40**<sup>2, 5, 7</sup>

17q25.3

- Juega un papel vital en el desarrollo de respuestas inmunitarias humorales

**IL-41**<sup>8</sup>

- Interleucina proinflamatoria secretada por macrófagos

*Tomado de (Ekmekcioglu et al., 2008)<sup>1</sup> (Justiz y Qurie, 2020)<sup>2</sup>, (HGNC, 2020)<sup>3</sup>, (Ballaun, 1998)<sup>4</sup>, (Owen, 2014)<sup>5</sup>, (Floss et al., 2017)<sup>6</sup>, (Catalan-Dibine et al., 2018)<sup>7</sup>, (Farc y Cristea, 2019)<sup>8</sup>*

**Tabla 5. Factores que promueven una regulación negativa sobre las HSCs.**

Citocina supresora	Efectos
<b>Factor de necrosis tumoral (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína producida por células monocito/macrófago, células B y T, timocitos, células de musculatura lisa y fibroblastos transformados</li> <li>• Señala a través de dos receptores distintos: el receptor p55 y el receptor p75</li> <li>• Inhibe la formación de colonias derivadas de GEMM-CFU, BFU-E y GM-CFU</li> <li>• Induce a la síntesis de CSF-GM por los fibroblastos o activación de los neutrófilos</li> </ul>
<b>Ferritina H</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producida por macrófagos, hepatocitos, y células Kupffer en el hígado</li> <li>• Inhibe la formación de colonias de progenitores maduros e inmaduras. Esta inhibición afecta a los progenitores que se encuentran en ciclo, en dosis-dependiente y ligada a la actividad ferro-oxidasa de la ferritina</li> </ul>
<b>Lactoferrina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína producida por neutrófilos</li> <li>• Acción inhibitoria indirecta, mediante la supresión de la liberación de CSF o IL-1. Esta acción es neutralizada por IL-6 o lipopolisacáridos bacterianos</li> </ul>
<b>Proteína inflamatoria macrófaga (MIP)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína secretada por macrófagos, se conocen tres subunidades (1<math>\alpha</math>, 1<math>\beta</math> y 2<math>\beta</math>)</li> <li>• muestra acción potenciadora sobre el desarrollo de los progenitores hematopoyéticos maduros <i>in vitro</i></li> <li>• Se le ha atribuido una acción supresora sobre la proliferación de progenitores hematopoyéticos primitivos</li> </ul>
<b>Prostaglandina E</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producida por: células epiteliales, fibroblastos, macrófagos, células del músculo liso y plaquetas</li> <li>• La PGE-1 y PGE-2 muestran una acción inhibitoria sobre los progenitores monocitarios (M-CFU), en menor medida sobre los GM y los comprometidos en la línea granulocítica (G-CFU)</li> <li>• Se le ha atribuido una acción contraria, objetivándose la capacidad de potenciar el crecimiento de colonias derivadas de BFU-E</li> </ul>
<b>Interferones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grupo de moléculas con propiedades fundamentalmente antivirales, los interferones tipo I (<math>\alpha</math> y <math>\beta</math>) son producidos por una variedad de tipos de células como linfocitos,</li> </ul>

**Inhibina / Factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ )**

- células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y osteoblastos a través del receptor IFN $\alpha$  /  $\beta$
  - Presentan una acción antimitótica sobre células normales y leucémicas. Esto justifica la acción inhibitoria del crecimiento de colonias derivadas de GEMM-CFU y BFU-E y en menor cantidad de GM-CFU
  - El interferón  $\gamma$  induce a la síntesis de CSF por monocitos y linfocitos T, para una acción estimulante indirecta
- 
- Producida por: linfocitos, monocitos/macrófagos y plaquetas.
  - La inhibina y activina componen una familia de moléculas de acción variable sobre diversos órganos, habiéndose demostrado su intervención en la liberación de FSH de células de la glándula pituitaria y de forma indirecta, a través de monocitos y linfocitos T, en el crecimiento de GEMM-CFU y BFU-E.
  - El TGF- $\beta$ , por su parte puede tener una acción inhibitoria directa sobre progenitores hematopoyéticos primitivos

**Receptores tipo Toll**

- Es una familia de receptores de reconocimiento de patrones transmembranales (PRRs) que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP).
- Se han descrito 10 miembros que juegan un papel central en la respuesta innata y adaptativa. Así mismo, los receptores TLR pueden regular la función de HSCs en humanos y puede conducir a la producción de múltiples citocinas como: IL-1 $\beta$ .
- Las HSCs expresan TLR como: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4 y TLR6 que pueden influir en el ciclo celular de las HSCs y pueden promover la diferenciación hacia un destino mieloide.
- También se ha demostrado que las HSCs movilizadas con G-CSF aumento sus niveles de TLR2 en comparación con las HSCs no movilizadas.
- Las citocinas inflamatorias producidas durante una infección o daño tisular ayudan a regular la expresión de TLR en las HSCs.
- La disfunción de receptores TLR se ha implicado en la progresión de leucemias, sofocando a células del sistema inmune, aumentan la inflamación e interrumpen la comunicación celular.

**Interleucinas**

- Proceden de múltiples fuentes, tales como monocitos/macrófagos, células dendríticas, NK, Linfocitos T y B, células epiteliales y endoteliales, fibroblastos, adipocitos, astrocitos o células de músculo liso

- IL-1: Provoca inflamación local y efectos sistémicos como fiebre, respuesta de fase aguda.
- IL-6: Induce inflamación y respuesta de fase aguda
- IL-8: Posee actividad angiogénica
- IL-9: Involucrado en alergias y asma
- IL-12: Induce a la producción de IFN $\gamma$
- IL-13: Involucrado en alergias y asma
- IL-14: Inhibe la síntesis de anticuerpos
- IL-17: Promueve la inflamación al aumentar la producción de células epiteliales, endoteliales y fibroblastos de citocinas proinflamatorias
- IL-18: Induce a la producción de IFN $\gamma$  por células T y aumenta la citotoxicidad por células NK
- IL-19: Induces especies reactivas de oxígeno y citocinas proinflamatorias
- IL-21: Aumenta la actividad citotóxica y la producción de interferón  $\gamma$  por células NK y células T CD8<sup>+</sup> activadas
- IL-22: Posee efectos anti- y proinflamatorios
- IL-25: Proinflamatoria. Puede contribuir a enfermedades de las vías respiratorias
- IL-32: Citocina proinflamatoria de la familia de IL-1 que induce a TNF- $\alpha$
- IL-36: Citocina proinflamatoria de la familia de IL-1 que estimula células dendríticas para que produzcan citocinas proinflamatorias

*Tomado de Fernández-Delgado et al., 1992; Branton y Kopp, 1999; Babeye et al., 1999; Schuettpeiz y Link, 2013; Owen, 2014; Camacho et al., 2017; Chiou y Connor, 2018; Lee et al., 2020*

## 5.2. LEUCEMIA

El término “Leucemia” se refiere a un grupo de enfermedades con diferentes antecedentes biológicos, presentación clínica, pronóstico y respuesta al tratamiento, que se caracteriza por una transformación maligna de las células hematopoyéticas que producen una población anormal (clon) de células que suprime la producción de sangre normal en la MO (Polychronakis *et al.*, 2013). Como en otros tipos de cáncer, la ontogenia de la leucemia es un proceso multivariado de alteraciones genéticas mediante las cuales, las células normales adquieren una sucesión de capacidades distintivas (Figura 6) (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011; Fouad y Aanei, 2017; Alkhazraji *et al.*, 2019).

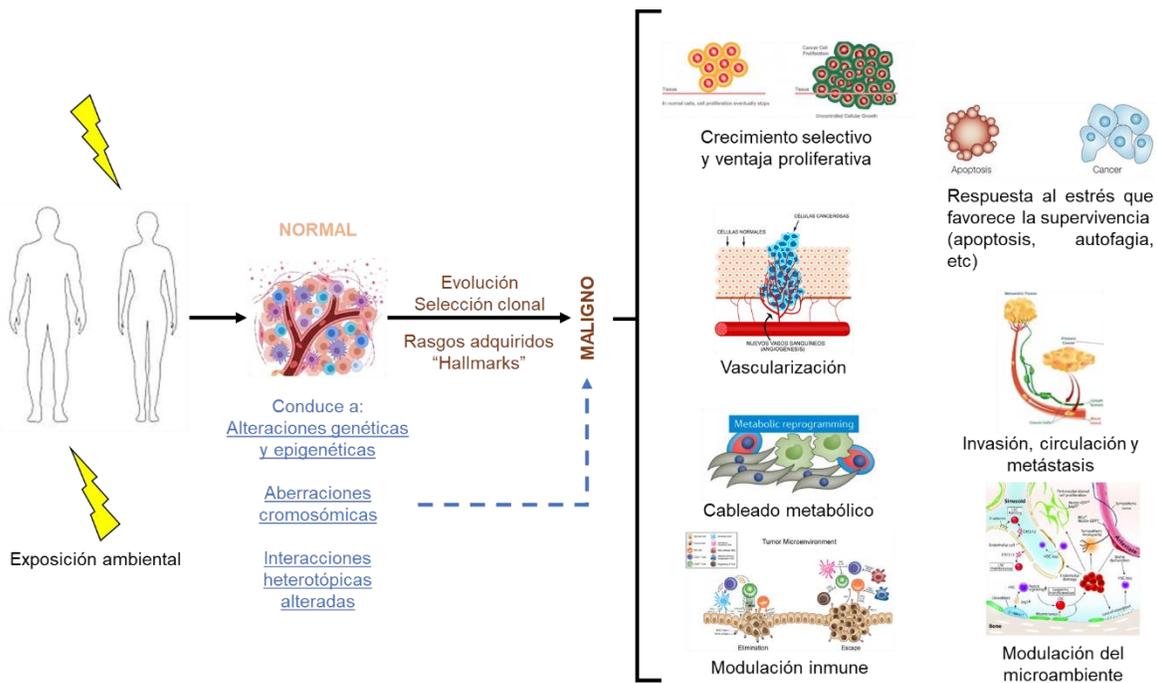


Figura 6. Rasgos adquiridos en células leucémicas. Diferentes exposiciones actúan continuamente sobre las células normales, lo que lleva a diferentes alteraciones que, a lo largo del camino hacia la malignidad, experimentan ciclos de selección evolutiva y clonal que conducen a la adquisición de rasgos competentes para el cáncer. Tomado y modificado de Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011; Fouad y Aanei, 2017; Alkhazraji *et al.*, 2019.

Los cuatro subtipos de leucemia (Tabla 6) de atención primaria son: Linfoblástica aguda (ALL), mieloide aguda (AML), linfocítica crónica (CLL) y mieloide crónica (CML) (Davis *et al.*, 2014).

**Tabla 6. Principales características de las leucemias.**

Subtipo de leucemia	Descripción	Causa/relación de enfermedad	Síntomas	Grupos que afecta	Tasa de supervivencia a 5 años
<b>Leucemia Mieloide Aguda</b>	Crecimiento incontrolado y exagerado de células indiferenciadas (llamados blastos), con características mieloides	Relación con exposición al benceno, radiación ionizante o exposición a quimioterapias	Cansancio, dificultad para respirar, palidez y sangrados, manchas en la piel, fiebre, infecciones y dolor en huesos	Adultos (ocurre en el 80%)	<50 años: 55% ≥50 años: 14%
<b>Leucemia Mieloide Crónica</b>	Se observa una gran proporción de glóbulos rojos maduros en relación con el número de células inmaduras. Presencia de una anomalía genética adquirida (cromosoma Ph que involucra a los cromosomas 9 y 22 (está fusión se conoce como BCR-ABL)).	Relación con exposición a radiación	Cansancio, palidez, diaforesis, pérdida de peso y molestias del lado izquierdo del abdomen debido al agrandamiento del bazo.	Adultos	<50 años: 84% ≥50 años: 48%
<b>Leucemia Linfoide Aguda</b>	Producción incontrolada de blastos con características linfoides y un bloqueo en la producción normal de glóbulos rojos, glóbulos	Relación con la radiación	Cansancio, falta de aliento, signos de sangrado, infecciones y fiebre, glándulas inflamadas, inflamación de los testículos, vómitos y	Niños y jóvenes adultos (53% de nuevos casos ocurren en personas <20 años)	<50 años: 75% ≥50 años: 25%

blancos y  
plaquetas

dolores de  
cabeza que  
sugieren  
afectación del  
sistema  
nervioso

<b>Leucemia Linfática Crónica</b>	Acumulación de linfocitos neoplásicos pequeños de aspecto maduro en la sangre, médula y tejidos linfoides secundarios	Exposición al agente naranja, insecticidas, poca evidencia de radiación ionizante.	Fatiga, pérdida de peso involuntaria, sudoración nocturna excesiva, plenitud abdominal con saciedad temprana y aumento de la frecuencia de infecciones relacionadas con hipogammaglo bulinemia, ganglios linfáticos agrandados, hepatomegalia y esplenomegalia	Adultos viejos (85% de nuevos casos ocurren en personas >65 años)	<50 años: 94%  ≥50 años: 83%
-------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------

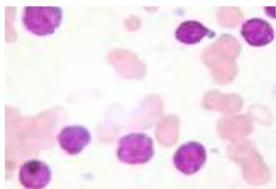
*Tomado y modificado de Hamerschlak, 2008; Davis et al., 2014; Kipps et al., 2017*

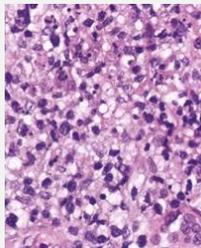
### 5.2.1. CLASIFICACIÓN

Las leucemias agudas se caracterizan por la proliferación incontrolada de células progenitoras mieloides o linfoides. Su clasificación morfológica se basa en la identificación de la línea celular de leucemia y la etapa de diferenciación celular. Durante la segunda mitad del siglo XX, se definieron varios subgrupos de leucemia, basados en la correlación entre su morfología y características clínicas, hallazgos de laboratorio y respuesta al tratamiento. Se propusieron varias clasificaciones y luego se descartaron como inadecuadas para todo tipo de pacientes. En algunos de éstos, los criterios eran ambiguos; algunos usaron métodos complicados y poco

reproducibles, mientras que otros usaron terminología diferente para describir el mismo tipo de leucemia, creando así una atmósfera de confusión. En 1976, esta situación llevó a 7 hematólogos a unirse para formar un grupo cooperativo internacional que dio origen al sistema de clasificación francoestadounidense británico (FAB), que dividió la leucemia en 2 tipos: mieloide y linfoblástica (Tabla 7). El sistema de clasificación solo puede usarse en pacientes no tratados previamente, ya que la quimioterapia distorsiona tanto las células normales como las malignas (Ladines-Castro *et al.*, 2016).

**Tabla 7. Clasificación Francoestadounidense británico (FAB) de leucemias agudas.**

Leucemia linfoblástica aguda					
Tipo	Morfología	Inmunofenotipo			
		B		T	
	L1 Leucemia linfoblástica con estructura homogénea.	Blastos homogéneos, núcleo regular, cromatina homogénea, nucleolos pequeños o nulos, el citoplasma escaso y basófilo leve a moderada.	CD19	CD3	CD7
			CD22	CD7	CD5
	L2 Leucemia linfoblástica con estructura variada.	Núcleo irregular, estructura de cromatina heterogénea, nucleolos grandes.	CD19	CD3	CD7
			CD22	CD7	CD5
	L3 Leucemia de Burkitt	Blastos grandes, nucléolos prominentes, estructura de cromatina punteada homogéneamente, citoplasma abundante, abundante vacuolación citoplasmática (tipo burbuja) que cubre el núcleo.	CD19	CD3	CD7
			CD22	CD7	CD5
			CD79a	CD5	CD2
			CD10	CD2	CD4
			CD20	CD4	

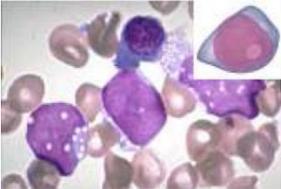
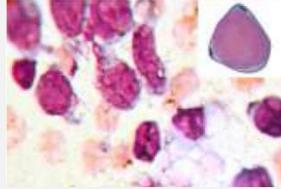


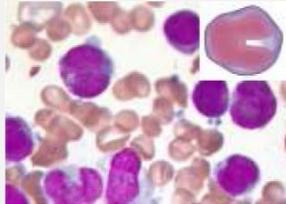
Linfoma extranodal nasal de células Natural Killer /células T

Infiltrado linforetico angiocentrico y polimorfico

CD16+  
CD2+  
CD3-  
CD3ε+  
CD16+  
CD45+  
CD56+  
Granulisisina

### Leucemia Mieloide Aguda

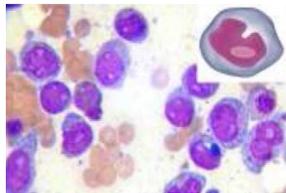
Tipo	Morfología	Inmunofenotipo
 <p data-bbox="553 636 732 825">MO Leucemia mieloblástica aguda con mínima diferenciación</p>	<p data-bbox="764 636 1138 863">Puede parecerse a blastos de LLA-L2. Blastos de tamaño mediano, núcleo redondeado, cromatina fina, citoplasma basófilo no granular, nucleolos prominentes.</p>	<p data-bbox="1162 636 1273 825">CD13+ CD33+ CD11b+ CD11c+ CD14+ CD15+</p>
 <p data-bbox="553 1035 732 1203">M1 Leucemia mieloblástica aguda sin maduración.</p>	<p data-bbox="764 936 1138 1335">Blastos de tamaño mediano con alta relación núcleo:citoplasma (n:c), núcleos redondeados con cromatina inmadura y dispersa con uno o más nucleolos prominentes. Los blastos pueden mostrar granulación azurofílica fina o bastones de Auer aisladas en el citoplasma en 5% a 10% de los casos.</p>	<p data-bbox="1162 1104 1273 1272">MPO+ CD13+ CD33+ CD117+ CD43+/-</p>
 <p data-bbox="553 1539 732 1707">M2 Leucemia mieloblástica aguda con maduración.</p>	<p data-bbox="764 1440 1138 1902">Blastos de tamaño pequeño a mediano con alta relación núcleo:citoplasma (n:c) y núcleos redondeados a veces ubicados en una esquina del citoplasma. El núcleo muestra cromatina inmadura dispersa con uno o más nucleolos. El citoplasma es basófilo y puede contener rastros de granulación azurofílica primaria o bastones de Auer aisladas.</p>	<p data-bbox="1162 1545 1354 1772">MPO+ CD34+/- CD13+ CD15+ HLA-DR +/- Sudan black + CD117 +/-</p>



M3  
Leucemia  
promielocítica

Abundante granulación intensamente azurofílica. El núcleo suele tener un aspecto monocítico (reniforme) y es irregular o bilobulado con una hendidura profunda. Citoplasma escasamente basófilo debido a la proliferación de granulación azurofílica. Algunos promielocitos atípicos también contienen inclusiones citoplasmáticas cristalinas alargadas o en forma de astilla específicas para este tipo de leucemia, que generalmente forman grupos, pero difieren de los bastones de Auer en que muestran una subestructura tubular en microscopía electrónica.

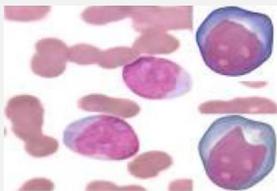
CD13+  
CD33+  
HLA-DR-  
CD34-



M4  
Leucemia  
mielo-  
monocítica  
aguda

Blastos largos, moderada relación núcleo:citoplasma (n:c) y forma basófila variable. El núcleo puede ser redondeado, en forma de riñón o irregular. Los nucléolos suelen ser prominentes.

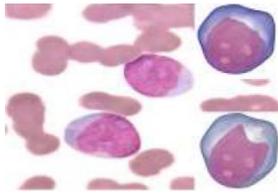
CD13+  
CD15+  
CD33+  
CD11b+  
CD11c  
CD14+  
CD64+  
CD4+



M5a  
Leucemia  
monoblástica  
aguda

Grandes blastos con núcleo redondeado y cromatina inmadura dispersa (1-3 nucleolos) y citoplasma basófilo moderadamente grande e intensamente. El citoplasma puede mostrar algunos bastones de Auer y/o prolongaciones y granulaciones.

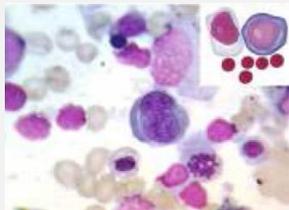
CD14+  
CD68+  
CD4+  
CD11c+  
HLA-DR+  
CD64+



M5b  
Leucemia  
monocítica  
aguda

Los promonocitos tienen un núcleo redondeado o en forma de riñón con un citoplasma menos basófilo que está más altamente granulado y que contiene algunos monoblastos y vacuolas. Un hallazgo de eritrofagocitosis junto con blastos monocíticos sugiere una translocación t (8;16).

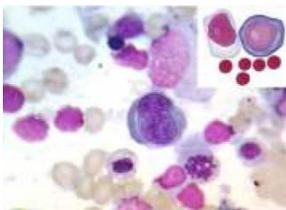
CD14+  
CD68+  
CD4+  
CD11c+  
HLA-DR+  
CD64+



M6a  
Leucemia  
eritroide con  
proliferación  
de blastos  
mixtos

Más del 50% de precursores eritroides y alrededor del 30% de mieloblastos. La morfología de los eritrocitos en la sangre periférica cambia enormemente, con esquistocitos, células "en forma de pinza" o en forma de hongo, y células de equinocitos y acantocitos espiculados.

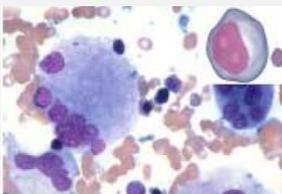
CD13+  
CD33+  
CD15+  
Glicoforina A+  
Glicoforina C+



M6b  
Leucemia  
eritroide pura

Los eritroides constituyen el 80% de las células de la MO, con menos del 3% de células mieloides. Los eritrocitos en la sangre periférica consisten en macrocitos, punteado basófilo, cuerpos de Howell-Jolly o anillos de Cabot.

CD13+  
CD33+  
CD15+  
Glicoforina A+  
Glicoforina C+

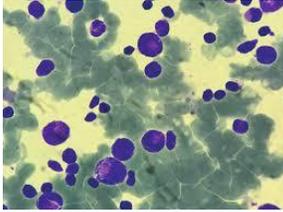


M7  
Leucemia  
mega-  
cariocítica  
aguda

Blastos polimórficos altamente inmaduros. El núcleo es excéntrico con cromatina reticulada dispersa y de 1-3 nucleolos prominentes. Citoplasma no granular, basófilo de apariencia similar a las plaquetas, con pseudopodos o granulaciones. Se observan micromegacariocitos y fragmentos de

CD41+  
CD61+  
CD42+  
CD13+  
CD33+  
CD34+

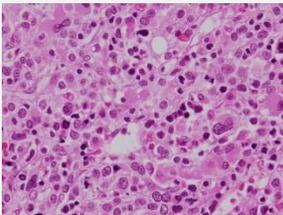
megacarioblastos en la sangre periférica (plaquetas gigantes, algunas altamente desgranuladas).



M8  
Leucemia  
basofílica  
aguda

Células blásticas con gránulos, presenta vacuolas en el citoplasma, núcleos ovales y bilobulados con nucleolos

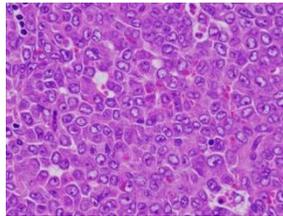
CD11b  
CD13+  
CD22+  
CD25+  
CD33+  
CD123+



Panmielosis  
aguda con  
mielofibrosis

Mieloblastos con ocasionales bastones de Auer. Algunos eritrocitos presentan núcleos

CD45+  
CD34+



Sarcoma  
mieloide

Blastos leucémicos aberrantes que pueden ser granulocitos, monoblastos o mielomonocíticos; también pueden ser mieloblastos, promielocitos y mielocitos eosinófilos

CD13  
CD33  
CD117  
MPO  
CD14  
CD163  
CD11c  
CD20  
CD45RO  
CD79a  
CD3

*Tomado de WHO Expert committee on the Selection, Use of essential medicines, 2014; Avni y Koren-Michowitz, 2011; Chatterjee et al., 2013; Luo et al., 2014; Ladines et al., 2016; Dufva et al., 2018; Harabuchi et al., 2019*

### 5.2.2. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

La leucemia mieloide aguda (AML) es un grupo hematológico agresivo y heterogéneo de neoplasias que se caracteriza por una mayor proliferación de células progenitoras mieloides y una capacidad reducida para diferenciarse (Skayneh *et al.*, 2019), está diferenciación bloqueada del linaje mieloide y la acumulación de células blásticas mieloides resulta en una falla catastrófica de la MO (Illangesearan *et al.*, 2019); la afectación de la sangre periférica es frecuente mientras que la infiltración a órganos, de manera más inquietante, al pulmón (Estey, 2018) y algunos pacientes también pueden presentar enfermedad extramedular, incluida la afectación del sistema nervioso central (Short *et al.*, 2018). La AML es la leucemia aguda más común en adultos, y representa aproximadamente el 80% de los casos en este grupo (De Kouchkovsky y Abdul-Hay, 2016). Aunque puede ocurrir en cualquier grupo de edad, la AML es predominantemente una enfermedad en adultos mayores, con una edad media al diagnóstico de 68 años (Short *et al.*, 2018). Para México, la edad media es de 32 a 44 años (Gómez-Almaguer *et al.*, 2017; Colunga-Pedraza *et al.*, 2018). Así mismo, nuestra población tiene una prevalencia significativamente mayor de M3 (con una incidencia del 35.5%), M7 y una prevalencia significativamente menor de leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica, Mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenström (Colunga-Pedraza *et al.*, 2018).

El criterio de 2016 de la Organización Mundial de la Salud (WHO) para la AML es al menos 20% de mieloblastos en la médula (o sangre) con linaje mieloide (por ejemplo, mieloblastos, monoblastos o megacarioblastos) establecido por citometría de flujo multiparamétrica (MFC). Ocasionalmente, los blastos mieloides pueden tener marcadores de células T o B, o pueden existir poblaciones mieloides y linfoides difícilmente separables. Esto se conoce como “leucemia aguda de fenotipo mixto” (MPAL) (Arber *et al.*, 2016) y no está claro si se debe manejar como AML, ALL, o ambas. Los casos con >20% de blastos, pero, que carecen de marcadores se denomina leucemia no diferenciada y a menudo se maneja como AML (Short *et al.*, 2018; Estey, 2018).

### 5.2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO

La AML se caracteriza por varias mutaciones recurrentes que afectan la biología y el fenotipo de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y el riesgo de recaída posterior (Short *et al.*, 2018). Actualmente se sabe que las mutaciones genéticas contribuyen a la patogénesis de la AML, de las cuales, se han agrupado en tres grupos de alteraciones: (1) mutaciones que afectan a los genes que contribuyen a la proliferación células (*FLT3*, *c-KIT*, *RAS*, *PTPN11.*); (2) Mutaciones que afectan a los genes implicados en la diferenciación mieloide (*AML1* y *CEBPA*) y (3) mutaciones que afectan a los genes implicados en la regulación del ciclo celular o la apoptosis (*TP53*, *NPM1*) (Renneville *et al.*, 2008) (Tabla 8).

**Tabla 8. Frecuencia y significancia clínica de los genes mutados en adultos con AML.**

Gen mutado	Frecuencia en %	Significancia clínica
<b><i>NPM1</i></b>	25-35	<p>AML con mutaciones <i>NPM1</i> una entidad clínico-patológica  Más frecuente en AML citogenéticamente normal (45-60% de los casos); frecuentemente asociado con otras mutaciones (p. ej., <i>FLT3-ITD</i> y mutaciones en <i>DNMT3A</i>, <i>IDH1</i>, <i>IDH2</i> y <i>TET2</i>)  En pacientes más jóvenes, la AML citogenéticamente normal con <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> se asocia con un resultado favorable; en general, no hay beneficio del trasplante alogénico de células hematopoyéticas en la primera RC.  Los pacientes mayores (&gt; 60 años) con AML mutada en <i>NPM1</i> se benefician de la quimioterapia intensiva convencional  Marcador genético para la evaluación de enfermedad residual mínima</p>
<b><i>CEBPA</i></b>	6-10	<p>Solo la AML con mutaciones bialélicas de <i>CEBPA</i> define la entidad clínico-patológica  La incidencia disminuye con la edad avanzada; asociado con AML citogenéticamente normal  Asociado con resultado favorable  Asociado con AML familiar</p>
<b><i>RUNX1</i></b>	5-15	<p>La incidencia aumenta con la edad avanzada; asociado con otras mutaciones (por ejemplo, en <i>ASXL1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>IDH2</i> y <i>KMT2A</i>)  Asociado con AML secundaria que evoluciona de un síndrome mielodisplásico</p>

Mutaciones de *RUNX1* predictivas de resistencia a la terapia de inducción y de resultado inferior  
 Asociado con el trastorno plaquetario familiar autosómico dominante que confiere una predisposición a la AML

<b>FLT3-ITD</b>	Aprox. 20	<p>Más frecuente en AML citogenéticamente normal (28-34% de los casos)          Asociado con un resultado desfavorable, particularmente en pacientes con una gran proporción de IDT mutante a tipo salvaje. Inserción de <i>ITD</i> en <math>\beta 1</math> del dominio de tirosina quinasa 1, o ambos          Los pacientes con AML positiva para <i>FLT3-ITD</i> pueden beneficiarse del trasplante alogénico de células hematopoyéticas en la RC de los primeros; Este efecto beneficioso puede estar restringido a pacientes con una alta proporción de <i>IDT</i> mutante a tipo salvaje          Los inhibidores de la tirosina quinasa con actividad contra <i>FLT3</i> están en desarrollo clínico</p>
<b>KIT</b>	<5	<p>Principalmente detectado en el factor de unión al núcleo AML (25-30% de los casos)          Confiere un pronóstico desfavorable en AML con t(8;21); efecto desfavorable en AML con inv(16)/t(16;16) menos formalmente establecido          Los inhibidores de la tirosina quinasa con actividad contra <i>KIT</i> están en desarrollo clínico</p>
<b>NRAS</b>	Aprox. 15	<p>Más frecuente en AML citogenéticamente normal, AML con inv(16)/t(16; 16) y AML con inv(3)/t(3;3)          El <i>RAS</i> mutante puede predecir la sensibilidad de la citarabina</p>
<b>DNMT3A</b>	18-22	<p>Evento temprano en leucemogénesis          La incidencia aumenta con la edad avanzada          Más frecuente en AML citogenéticamente normal (30-37% de los casos); asociado con mutaciones <i>NPM1</i> y <i>FLT3-ITD</i>          Efecto adverso moderado sobre el resultado; posiblemente limitado al subgrupo molecular ELN desfavorable de AML citogenéticamente normal          Asociado con hematopoyesis clonal en personas mayores sanas</p>
<b>ASXL1</b>	5-17	<p>Evento temprano en leucemogénesis          La incidencia aumenta con la edad avanzada          Asociado con AML secundaria que evoluciona de un síndrome mielodisplásico</p>

		<p>Mutaciones concurrentes frecuentes (p. Ej., En <i>RUNX1</i>, <i>srsf2</i>, e <i>IDH2</i>)</p> <p>Mutaciones de <i>ASXL1</i> predictivas de resultado inferior</p> <p>Asociado con hematopoyesis clonal en personas mayores sanas</p>
<b>IDH1 e IDH2</b>	<p>IDH1: 7-14;</p> <p>IDH2: 8-19</p>	<p>La incidencia de la mutación <i>IDHR140</i> aumenta con la edad avanzada</p> <p>Las mutaciones <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> son más frecuentes en la AML citogenéticamente normal (25-30% de los casos); asociación con mutaciones <i>NPM1</i> (excepto <i>IDH2R172</i>)</p> <p>Importancia pronóstica dependiente del contexto mutacional (estado <i>NPM1</i> y <i>FLT3-ITD</i>) y del tipo de mutación (los inhibidores <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> son desarrollo clínico)</p> <p>Las mutaciones <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i> pueden identificar a los pacientes que probablemente tengan un respiro a la inhibición farmacológica de <i>BCL2</i></p>
<b>TET2</b>	7-25	<p>Evento temprano en leucemogénesis</p> <p>La incidencia aumenta con la edad avanzada</p> <p>Mutuamente excluyentes de las mutaciones <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i></p> <p>La importancia pronóstica no se establece finalmente; En algunos estudios, las mutaciones <i>TET2</i> se asocian con una supervivencia inferior entre los pacientes con AML citogenéticamente normal o en el subgrupo <i>ELN</i> favorable de AML citogenéticamente normal.</p> <p>Asociado con hematopoyesis clonal en personas mayores sanas</p>
<b>KMT2A-PTD</b>	5	<p>Asociado con AML citogenéticamente normal (3-11% de los casos) y trisomía 11 (hasta un 90% de los casos)</p> <p>Posible efecto adverso moderado sobre el resultado, pero no es un factor pronóstico independiente</p>
<b>TP53</b>	Aprox. 8	<p>La incidencia aumenta con la edad avanzada</p> <p>Alteraciones de <i>TP53</i> detectadas predominantemente en AML con cariotipo aberrante complejo (deleciones, mutación o ambas en 56-78% de los casos)</p> <p>Mutaciones asociadas con -5 o del (5q), -7 o del (7q), cariotipo monosómico y complejidad genómica, entre otros factores</p> <p>Las mutaciones de <i>TP53</i> confieren un resultado muy pobre</p>

Tomado de Döhner et al., 2015

## 5.2.4. TRATAMIENTO

### PRETRATAMIENTO

La comprensión biológica de la AML se debe a su naturaleza subclonal y su heterogeneidad; así como los factores relacionados con el paciente y la enfermedad que contribuyen a la probabilidad de que un paciente logre la respuesta al tratamiento y la supervivencia a largo plazo (Short *et al.*, 2018) La edad, el desarrollo de la enfermedad, además de las aberraciones cromosómicas y moleculares, siguen siendo las herramientas más importantes para la predicción de resultados en la AML (Tabla 9) (Saultz y Garzon, 2016).

**Tabla 9. Test comunes de laboratorio para la evaluación de las leucemias.**

Test	Descripción	Aplicación clínica
<b>Aspirado o biopsia de MO</b>	Examen de una mayor concentración de células hematopoyéticas.	Identificación de células blásticas en AML y ALL. El grado de afectación medular se correlaciona con el pronóstico en la CLL.
<b>Prueba citogenética</b>	Examen de cromosoma completo a través de cariotipo o análisis de hibridación fluorescente <i>in situ</i>	Detección del cromosoma Filadelfia (gen de fusión <i>BCR-ABL1</i> ) para el diagnóstico de CML. Identificar anomalías cromosómicas para diagnosticar subtipos de leucemia. Puede usarse para guiar el tratamiento y determinar el pronóstico.
<b>Citometría de flujo por inmunofenotipo</b>	Clasificación y recuento de células (de muestras de sangre periférica o de MO) por marcadores específicos de la superficie celular	Contar células clonadas de linaje linfóide para el diagnóstico de CLL. Identificar ciertos marcadores de la superficie celular para diagnosticar subtipos de leucemia.
<b>Prueba molecular</b>	Prueba de mutaciones específicas a nivel de ADN a través de la prueba de PCR	Detección del cromosoma Filadelfia (gen de fusión <i>BCR-ABL1</i> ) para el diagnóstico de CML.

Ayuda en el diagnóstico de subtipos de leucemia; también se puede usar para guiar el tratamiento y determinar el pronóstico.

**Frotis periférico** Examen de muestras de sangre completa bajo el microscopio. Identificación de bastones de Auer en AML y células blásticas en AML y ALL.

Tomado de Davis et al., 2014

En 2010, se creó el esquema de clasificación europeo LeukemiaNet (ELN) en un esfuerzo por estandarizar la estratificación del riesgo en pacientes adultos con AML mediante la incorporación de anomalías citogenéticas y moleculares. Los pacientes se clasifican en uno de los cuatro grupos de riesgo: favorable, intermedio I, intermedio II y adverso (Saultz y Garzon, 2016). Los análisis genéticos, que incluyen tanto el cariotipo como la detección de fusiones genéticas recurrentes y mutaciones moleculares, brindan información importante sobre la biología de la enfermedad e informan fuertemente la evaluación del pronóstico, que a su vez se utiliza para guiar las decisiones sobre la terapia post remisión (Short *et al.*, 2018) (Tabla 10).

**Tabla 10. Grupos de estratificación de riesgo propuesto por ELN, basado en el perfil citogenético y molecular**

Estratificación de riesgo	Perfil citogenético solo	Perfil citogenético y anomalías moleculares.
<b>Favorable</b>	t(8:21)(q22;q22) inv(16)(p13.1q22) t(15:17)(q22;q12)	t(8:21)(q22;q22) sin mutación en <i>c-KIT</i> inv(16)(p13.1q22) t(15:17)(q22;q12) <i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3-ITD</i> (CN-AML) mutación bialélica <i>CEBPA</i> (CN-AML)
<b>Intermedio I</b>	CN-AML t(9:11)(p22;q23); <i>MLL3-KMT2A</i>	<i>NPM1</i> y <i>FLT3-ITD</i> mutados (cariotipo normal) <i>NPM1</i> y <i>FLT3-ITD</i> de tipo “salvaje” (cariotipo normal) <i>NPM1</i> sin <i>FLT3-ITD</i> de tipo “salvaje” (cariotipo normal)

<b>Intermedio II</b>	CN-AML t(9:11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i>	CN-AML* t(9:11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> Anormalidades citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
<b>Adverso</b>	inv(3)(q21q26.2) t(6:9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(3:3)(q21;q21;q26.2): <i>GATA2-MECO (EV11)</i> t(v:11)(v;q23); <i>KMT2A</i> reorganizado q11, anormalidades que no sean t(9;11)-5 o del (5q)-7 Con cariotipo complejo	Mutaciones de <i>TP53</i> sin importar el perfil citogenético CN en <i>FLT3-ITD</i> CN en <i>DNMT3A</i> CN en <i>KMT2A-PTD</i> inv(3)(q21q26.2) t(6:9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(3:3)(q21;q21;q26.2); <i>GATA2-MECO (EV11)</i> t(v:11)(q;q23): <i>KMT2A</i> reorganizado q11, anormalidades que no sean t(9:11)-5 o del (5q)-7 Con cariotipo complejo

\*CN-AML: Casos de AML con un riesgo de pronóstico intermedio constituyen una citogenética normal

Tomado de De Kauchkovsky y Abdul-Hay, 2016; Saultz y Garzon, 2016

La evaluación precisa del pronóstico es fundamental para el manejo de la AML. Al estratificar a los pacientes de acuerdo con su riesgo de resistencia al tratamiento o mortalidad relacionada con el tratamiento, los factores pronósticos ayudan a guiar al médico a decidir entre la intensidad de tratamiento estándar o aumentada, la quimioterapia de consolidación o el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (allo-HSCT), o más fundamentalmente al elegir entre los establecidos o terapias de investigación. Entre los factores clínicos, el aumento de la edad y el estado de bajo rendimiento están asociados con tasas más bajas de remisión completa (RC) y una disminución de la supervivencia general (SG) (De Kauchkovsky y Abdul-Hay 2016; Short *et al.*, 2018).

## ENFOQUE GENERAL DEL TRATAMIENTO

A diferencia de otros tipos de leucemia, el tratamiento de la leucemia aguda no depende de cuánto haya avanzado la enfermedad, sino de la condición de la persona. ¿El paciente tiene la enfermedad *de novo*? O ¿el paciente se encuentra

en una recaída después de una RC? Con la AML, el tratamiento generalmente depende de la edad de la persona y la salud general; así como de su recuento de células sanguíneas (Harvard Health Publishing, 2014).

### **TERAPIA DE INDUCCIÓN**

Desde 1970, una combinación de citarabina y una antraciclina ha sido el régimen de inducción estándar para pacientes considerados adecuados para la terapia intensiva de AML (para adultos jóvenes (edad <60 años) y pacientes ancianos en forma (especialmente aquellos que albergan mutaciones *NPM1* y leucemia CBF)) con el régimen “7 + 3”: 7 días de citarabina infundida (100–200 mg/m<sup>2</sup> al día) más 3 días de antraciclina (p. Ej., Daunorubicina -60 o 90 mg/m<sup>2</sup> en los días 1, 2 y 3- o idarubicina -10–12 mg/m<sup>2</sup> en los días 1, 2 y 3-). El objetivo de la quimioterapia de inducción es lograr la RC, que se define como: (1) <5% de blastos en muestra de aspirado de MO con espículas de médula y con un recuento de ≥200 células nucleadas (sin blastos con bastones de Auer o persistencia de enfermedad extramedular); (2) recuento absoluto de neutrófilos (ANC) >1000/μL, y (3) plaquetas ≥100,000/μL, reduciendo drásticamente la carga de leucemia en los pacientes. El pronóstico y los resultados de la enfermedad en adultos y ancianos, que representa la mayoría de los pacientes con AML, sigue siendo deficiente (Saultz y Garzon 2016; Short *et al.*, 2018; Illangesearan *et al.*, 2019).

Las personas mayores de 65 años tienen más probabilidades de presentar un perfil de riesgo citogenético adverso, tienen menos probabilidades de responder a la quimioterapia y, a menudo, son más susceptibles a las toxicidades relacionadas con el tratamiento (De Kauchkovsky y Abdul-Hay 2016) por lo que el uso de agentes hipometilantes, incluyendo decitabina y azacitidina, ha demostrado ser beneficioso. Ambos agentes, comúnmente utilizados para tratar la mielodisplasia, tienen actividad en la AML como terapia de inducción inicial (Saultz y Garzon, 2016).

### **TERAPIA DE CONSOLIDACIÓN**

La terapia posterior a la RC se administra para prevenir la recaída y erradicar la leucemia residual mínima (MRD) en la MO después de la inducción como un puente

para el allo-HSCT o para lograr la cura. En general, hay dos estrategias principales para la consolidación; quimioterapia (incluidos por agentes específicos) y allo-HSCT (Saultz y Garzon, 2016). Para aquellos pacientes con enfermedad de riesgo intermedio, no existe consenso con respecto a la terapia óptima posterior a la RC, y el tratamiento debe individualizarse sobre la base de una evaluación completa del riesgo de recaída, la aptitud del paciente, la idoneidad de un donante adecuado y la preferencia del paciente (Short *et al.*, 2018).

La quimioterapia de consolidación con un régimen basado en citarabina es la atención estándar para los pacientes que alcanzan la RC después de la quimioterapia de inducción y en quienes no se recomienda el allo-HSCT. La adición de otros medicamentos al régimen de citarabina para la consolidación también podría ser beneficiosa en algunos subgrupos de AML. Por ejemplo: midostaurina o clofarabina (análogo de nucleósido de purina a la citarabina). Después de la quimioterapia de consolidación, no se ha establecido ningún papel para el mantenimiento adicional en el tratamiento de la AML. Sin embargo, se están investigando varias estrategias de mantenimiento, como medicamentos dirigidos y enfoques inmunes. Generalmente se administran cuatro ciclos de consolidación, aunque el número óptimo de ciclos de consolidación no se ha establecido firmemente. Con este régimen de consolidación de dosis altas de citarabina, se ha logrado una supervivencia a largo plazo de aproximadamente el 50% en pacientes menores de 60 años que logran la RC con quimioterapia de inducción. Los pacientes mayores ( $\geq 60$  años) tienen menos probabilidades de beneficiarse o tolerar la citarabina intensiva, excepto quizás la pequeña proporción de aquellos con citogenética de riesgo favorable (Tabla 11) (Short *et al.*, 2018). Estudios *in vitro* y preclínicos con agentes novedosos en combinación con medicamentos quimioterapéuticos estándar podrán allanar el camino a la introducción de agentes prometedores que ayudarían a personalizar la terapia para pacientes con AML (Illangesearan *et al.*, 2019).

**Tabla 11. Tratamiento actual convencional para pacientes con AML.**

Terapia	Régimen	Comentarios
<b>Terapia de inducción</b>		
<b>Pacientes de 16-60 años</b>	3 días una antraciclina vía intravenosa (daunorrubicina 60mg/m <sup>2</sup> o mitoxantrona 10-12 mg/m <sup>2</sup> ) y 7 días de una infusión continua de citarabina (100-200 mg/m <sup>2</sup> ) (régimen “7+3”) en 1 o 2 ciclos <sup>1,2</sup> .	Una inducción secundaria es comúnmente usada en pacientes solamente con remisión parcial
<b>Pacientes &gt;60 años</b>	Para pacientes con riesgo citogenético favorable y riesgo citogenético intermedio, la terapia de inducción es la misma que los pacientes jóvenes, y una reducción de las dosis puede ser considerada individualmente, dependiendo del paciente. Regularmente, se da un solo ciclo de dosis <sup>3</sup> .	Pacientes con riesgo citogenético adverso, coexisten condiciones, ya que existen condiciones para la terapia de inducción
<b>Terapia de consolidación</b>		
<b>Pacientes de 16-60 años</b>	Pacientes con un riesgo citogenético favorable (de acuerdo con la ELN) pueden recibir de 2-4 ciclos de dosis intermedias de citarabina (1000-1500 mg/m <sup>2</sup> intravenosa en los días 1-6); para pacientes con riesgo intermedio o	Allo-HSCT puede ser considerado en lugar de la quimioterapia de consolidación

adverso, al allo-HSCT puede ser fuertemente considerada; si no es posible, una terapia de consolidación puede ser administrada como anteriormente se administraba, y una combinación de quimioterapia (p. ej. Mitoxantrona-citarabina) que puede ser superior para los pacientes con riesgo adverso.

para pacientes seleccionados que no han tenido una RC y poseen un alto riesgo

### **Pacientes >60 años**

Pacientes con un riesgo genético favorable (de acuerdo con la ELN) poco común y no coexisten condiciones favorables, deben recibir de 2-3 ciclos de dosis intermedias de citarabina (500-1000 mg/m<sup>2</sup> intravenosa, cada 12hr en los días 1-3 o 500-1000 mg/m<sup>2</sup> intravenosa, cada 12hr en los días 1-6).

Para pacientes con riesgo genético desfavorable, y que coexisten condiciones, sin evaluar la terapia de consolidación intensiva establecida, una terapia para estos pacientes debe ser investigada.

## **Allo-HSCT**

### **Para pacientes que son elegibles para recibir una terapia intensiva**

Solo para pacientes con riesgo favorable o riesgo intermedio, no con riesgo adverso: bajas dosis de citarabina (20 mg cada 12 h, subcutáneo, en los días 1-10, cada 4 semanas; hasta haber progresión.)

Agentes hipometilantes: decitabina 20 mg/m<sup>2</sup>, intravenosa en los días 1-5 por 4 semanas, hasta haber progresión; azacitadina 75 mg/m<sup>2</sup>, subcutáneo, en los

La determinación del tratamiento elegible se basa en condiciones anteriormente evaluadas, complicaciones recientes, estado y elección del paciente

días 1-7 cada 4 semanas, hasta haber progresión.

Considere una investigación para la terapia adecuada en todos los pacientes.

Mejor tratamiento de apoyo en pacientes que no reciben con seguridad alguna terapia antileucémica.

**Terapia para pacientes que recayeron con AML o una inducción primaria**

Edad avanzada, estado general de salud pobre, refractariedad primaria o baja duración de la RC (<6 meses), factores genéticos adversos y el allo-HSCT son factores de mayor riesgo.

**Pacientes para quienes la terapia de rescate intensiva se considera adecuada**

Régimen convencional de tratamiento intensivo: citarabina (1000-1500 mg/m<sup>2</sup>, intravenosa cada 12 h, en los días 1-3 (500-1000 mg/m<sup>2</sup> en pacientes >60 años); o 1000-1500 mg/m<sup>2</sup>, intravenosa en los días 1-6 (500-1000 mg/m<sup>2</sup>, en pacientes >60 años); con o sin daunorrubicina de 45-60 mg/m<sup>2</sup>, intravenosa los días 1-3; o mitoxantrona 8-10 mg/m<sup>2</sup>, intravenosa los días 1-3.

MEC: Mitoxantrona 8 mg/m<sup>2</sup>, en los días 1-5; etopósido 100 mg/m<sup>2</sup>, en los días 1-5; citarabina 1000 mg/m<sup>2</sup>, en los días 1-5

FLAG-IDA: Fludarabina 30 mg/m<sup>2</sup>, intravenosa, en los días 1-5 (20 mg/m<sup>2</sup>, en pacientes >60 años); citarabina 1500 mg/m<sup>2</sup>, (500-1000 mg/m<sup>2</sup>, en pacientes >60 años) intravenosa, 4 horas después de la infusión de la fludarabina, en los días 1-5; idarrubicina 8 mg/m<sup>2</sup>, intravenosa, en los días 3-5; con G-CSF 5 µg/Kg, subcutáneo, al día 6, hasta que el conteo de células blancas sea >1 g/L.

Consideración de reducción de dosis en pacientes, en particular, en pacientes mayores (>60 años) y en pacientes con recaída después de allo-HSCT.

Allo-HSCT para pacientes con RC; este trasplante conduce a una mejor reducción, pero no a la auténtica RC, se considera la reinducción (dosis reducidas) y la intensidad se reduce dependiendo del paciente y de las allo-HSCT.

**Pacientes para quienes la terapia de rescate intensiva no se considera adecuada**

Bajos regímenes de intensidad, tales como, bajas dosis de citarabina, agentes hipometilantes, o para un soporte (incluye hidroxiurea); con la finalidad de preservar una calidad de vida mejor.

*Tomado de Döhner et al., 2015; Bradstock et al., 2005<sup>1</sup>; Schwarzer et al., 2018<sup>2</sup>; Sekeres et al., 2020<sup>3</sup>.*

Aunque la tasa general de supervivencia a 5 años de los pacientes con AML mejoró mediante la aplicación de la quimioterapia estándar, la supervivencia a largo plazo de los pacientes con AML se alcanza solo en el 35-45% de los menores de 60 años y en el 10-15% de los mayores de 60 años. Sin terapia, esta enfermedad conduce a la muerte del paciente en unas pocas semanas (Saultz y Garzon, 2016; Behrmann *et al*, 2018; Short *et al.*, 2018). En nuestro país, se informó que la mortalidad durante las primeras 6 semanas de tratamiento fue del 10% en pacientes menores de 60 años y del 24% en pacientes mayores de 60 años. También entre nuestra población, el 86.4% de los pacientes que se sometieron a quimioterapia intensiva tenían <60 años y, por lo tanto, teniendo en cuenta estos datos, la mortalidad general relacionada con la inducción que observamos en nuestra población (17.8%) es considerablemente alta (Demichelis-Gómez *et al* 2020). En un estudio realizado por Lancet y colaboradores en 2018; Se puso a prueba la eficacia de la terapia de inducción tradicional “7+3” contra CPX-351 (El liposoma CPX-351 encapsula la citarabina y la daunorrubicina en una proporción sinérgica de fármacos molares en una proporción 5:1, respectivamente, que se mantiene en el plasma humano durante 24 horas después de su administración (Kolitz *et al.*, 2019)). Este tratamiento novedoso mostró una SG a corto plazo de 9.56 meses para CPX-351 vs. 5.95 meses para “7+3” y las estimaciones Kaplan-Meier de SG a 1 año fueron de 41.5% para CPX-351 vs. 27.6% para “7+3” y a 2 años fue de 31.1% y 12.3% respectivamente, así mismo, CPX-351 mostró tener una tasa de eventos adversos más bajo que “7+3” sugiriendo que CPX-351 puede tener un perfil de toxicidad general “más” favorable que la terapia de inducción tradicional; sin embargo, a largo plazo, se mostró que el régimen “7 + 3” mostraba una SG más prolongada (31 meses) que en comparación con CPX-351 (26.5 meses) (Lancet *et al.*, 2018). A pesar de las múltiples alternativas que los pacientes tienen a su disposición, se ha informado que estos fármacos contienen efectos hepato- y cardiotoxicos, provocan mielosupresión y síndrome de lisis tumoral (Hwang *et al.*, 2019). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de tratamiento dirigido de baja intensidad para mejorar la supervivencia de los pacientes con AML (Behrmann *et al.*, 2018) con la posibilidad de bajar la citotoxicidad en las células normales.

### **5.3. CASEÍNAS Y CASEINATO DE SODIO**

La leche es una mezcla heterogénea de secreción láctea de numerosos componentes (carbohidratos como oligosacáridos, lípidos como ácido graso poliinsaturado de cadena larga, microbiota específico de la leche, etc.) que exhiben una amplia variedad de actividades químicas y funcionales (Gill *et al.*, 2000). La leche bovina, la más frecuentemente consumida, está constituida por 3,6 % de proteínas, 4,1 % de grasas, 5,0 % de carbohidratos, menos de 1 % de vitaminas y minerales y 86,6 % de agua (Kon, 1977). Las proteínas de la leche pueden clasificarse ampliamente en 3 categorías: caseínas, proteínas de suero y mucinas (Johnsen *et al.*, 1995); de éstas, la caseína es el principal componente (80 %) y está presente en forma de micelas, partículas esféricas de dimensión no uniforme (Walstra y Jenner, 1984). La micela de la caseína está compuesta por cuatro subunidades polipeptídicas denominadas caseínas  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - y  $\kappa$ - caseína (Warner, 1976; Hall, 1971). Además, tiene su forma de sal: caseinato de sodio (CS) que posee una importante aplicación en la industria alimentaria (Warner, 1976; Walstra y Jenner, 1984). La caseína es insoluble en agua, sin embargo, al ser diluida en un álcali a pH 6.6 origina ciertos preparados solubles llamados caseinatos. El CS es producto de la disolución de la caseína en una solución de hidróxido de sodio seguido de evaporación hasta que la humedad se reduce a un 4%; tras lo cual se obtiene un polvo blanco o incoloro, soluble en agua y sin sabor con 65% de proteínas (Walstra y Jenner, 1984).

#### **5.3.1. CASEÍNAS Y LEUCEMIA**

En diversas publicaciones se ha sugerido que la caseína, o que algunos de sus componentes, producto de su digestión enzimática, pudiera ser una biomolécula reguladora de la hematopoyesis más allá del aporte de aminoácidos para la dieta humana (Santiago-Osorio *et al.*, 2010). El CS fue usado hace más de 30 años para producir una respuesta inflamatoria en la cavidad peritoneal de ratón (Lotem y Sachs, 1983). Posteriormente algunos factores de crecimiento que incluían M-CSF, G-CSF y GM-CSF fueron detectados en altas concentraciones en ratones tratados con caseínas o CS (Lotem and Sach, 1985; Metcalf *et al.*, 1996). Nuestro equipo de

trabajo considera el efecto de la caseína y sus componentes en la modulación de la proliferación y diferenciación *in vitro*, así como su papel *in vivo* en la supervivencia de ratones en modelos de leucemia temprana (Tabla 12).

**Tabla 12. Efectos de la caseína, sus componentes y el CS en la modulación de células normales y leucémicas**

<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
El CS reduce la proliferación e induce diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago en la línea células 32Dcl3 en presencia de IL-3 (Ramos-Mandujano <i>et al.</i> 2004).	El CS incrementa el % de precursores mieloides y granulocitos segmentados y se observó un decremento en la población de linfocitos en MO de ratón (Domínguez-Meléndez <i>et al.</i> , 2012).
CS y $\alpha$ -caseína inducen la síntesis de proteína M-CSF y TNF- $\alpha$ , Las células 32D y WEHI-3 son inducidas para expresar TGF- $\beta$ por la $\alpha$ , $\beta$ y $\kappa$ -caseína, pero en mayor proporción por el CS (Ledesma-Martínez <i>et al.</i> , 2005).	El CS induce proliferación de células de MO a través de la incorporación de BrdU en las CMN de MO de ratones tratados con CS (Domínguez-Meléndez <i>et al.</i> , 2012).
Se reveló que el CS inhibe la proliferación celular de la línea celular 32Dcl3 en dosis de 0.1 mg/ML y $\kappa$ -caseína con una dosis de 0.5mg/ML en WEHI-3 sin afectar la viabilidad celular de ambas líneas (90%) (Ramos-Mandujano <i>et al.</i> , 2008).	Se generó un modelo de leucemia en ratón con células WEHI-3, el CS inoculado i. p. redujo notablemente la hepatomegalia y la presencia de tumores sólidos, además de que la tasa de supervivencia fue del 40% después de 40 días en comparación de los no tratados (día 28) (Ledesma-Martínez <i>et al.</i> , 2012).
El CS y sus subunidades $\alpha$ , $\beta$ y $\kappa$ -caseína induce la diferenciación celular a monocitos/macrófagos en 32Dcl3, pero no en WEHI-3, en presencia de 0.1 mg/ml (Ramos-Mandujano <i>et al.</i> , 2008).	Se desarrolló un modelo de ratón (BALB/c ♂ y ♀) con células leucémicas J774. Se descubrió que estas células causan en el organismo del ratón esplenomegalia, hepatomegalia y tumores sólidos (Córdova-Galaviz <i>et al.</i> , 2014).
El CS y sus subunidades inducen a la expresión de mRNA de M-CSF y M-CSFR en 32Dcl3, Pero en WEHI-3 solo CS y $\alpha$ -caseína induce la secreción de M-CSF y todas inducen la expresión en membrana del receptor del M-CSF (Ramos-Mandujano <i>et al.</i> , 2008).	El tratamiento con CS redujo la esplenomegalia, la hepatomegalia y los tumores sólidos, sobreviviendo hasta 160 días + con 60% de hembras y 50% de machos y el cultivo <i>in vitro</i> demostró que CMN de MO no son capaces de vivir si rmlL-3 (Córdova-Galaviz <i>et al.</i> , 2014).

El CS induce la diferenciación de células en banda a neutrófilos polimorfonucleares en un 48% en 24 h y un 59% en 48 h (Santiago-Osorio *et al.*, 2009).

El CS incrementa el conteo de CMN de sangre periférica de ratones BALB/c similar a Plerixafor y se demostró que el CS moviliza más células LSK en comparación de Plerixafor (0.5% vs. 0.3 respectivamente) (Santiago-Osorio *et al.*, 2015).

El CS provoca que los neutrófilos secreten M-CSF, a diferencia de rhG-CSF que provoca solo la secreción de G-CSF (Santiago-Osorio *et al.*, 2009).

El CS provocó una mayor sobrevivencia de ratones irradiados letalmente debido a que puede movilizar más CMN de MO injertadas en comparación con Plerixafor (CS hizo sobrevivir el 40% de ratones en 20 semanas en comparación con el 10% de ratones en 19 semanas con Plerixafor) después de este tiempo, estas células lograron formar colonias de granulocitos, macrófagos, eritroides, granulocito-macrófago y mixtas (Santiago-Osorio *et al.*, 2015).

El CS induce la proliferación y activación de granulocitos e incrementa la concentración en suero de citocinas como G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Domínguez-Meléndez *et al.*, 2012).

La inyección i. p. de CS disminuyó el % de células correspondientes al linaje linfóide en MO ( $11.33 \pm 1.15$  de CS vs.  $18.66 \pm 2.08$ ), así como la incorporación de BrdU ( $32.03 \pm 2.64$  vs.  $50.33 \pm 4.50$  de vehículo) (Domínguez-Meléndez *et al.*, 2017).

La caseína redujo la actividad metabólica en un 75% e indujo la muerte celular en las células WEHI-3 en un <90%, pero no afectó la viabilidad de las CMN (Ledesma-Martínez *et al.*, 2012).

El tratamiento i. p. con CS aumentó el % de células correspondientes al linaje mielóide en el bazo ( $89.01 \pm 1.03$  de CS vs.  $75.66 \pm 2.08$  de vehículo), así como su incorporación de BrdU ( $34.59 \pm 4.48$  de CS vs.  $11.82 \pm 1.04$  de vehículo) (Domínguez-Meléndez *et al.*, 2017).

La caseína induce a la fragmentación de ADN de las células leucémicas WEHI-3 pero no en las CMN de MO normales, en una concentración de 2 mg/mL (Ledesma-Martínez *et al.*, 2012)

Se evaluó la concentración de suero de ratones tratados con CS y vehículo y se demostró que la concentración de IL-2, IL-7 e IL-15 (citocinas clave en la linfopoyesis B de ratón) aumentó considerablemente en los tratados con CS que en los vehículos ( $62.1 \pm 17.5$  vs.  $26.9 \pm 4.4$  respectivamente) (Domínguez-Meléndez *et al.*, 2017).

La caseína redujo en un >40% la proliferación de células WEHI-3 e indujo la proliferación de CMN de MO en un 50% en una concentración de 2 mg/mL (Ledesma-Martínez *et al.*, 2012)

Ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con dosis de 1, 2 y 4 g/Kg de peso de ratón fueron tratados cada 48 h vía i.p. usando las dosis clínicas de AML (3 mg/Kg para cita y 0.5 mg/Kg para dauno). Se demostró así que las dosis más exitosas fueron: 2 mg/Kg de CS con 20% de la población para el día 38, 3 mg/Kg para cita con el 10% de la población para el día 38 y 0.5 mg/Kg de dauno con el 40% de la población para el día 40 (Meléndez-Ibarra, 2019).

El CS induce la proliferación celular del linaje granulocítico (Domínguez-Meléndez *et al.*, 2012).

Un ensayo ELISA reveló que los niveles de G-CSF y GM-CSF aumentaron en el suero de ratones tratados con CS (Domínguez-Meléndez *et al.*, 2012).

Se demostró que las células tratadas con CS tienen un índice fagocítico más alto que ratones control en granulocitos / neutrófilos (Domínguez-Meléndez *et al.*, 2012).

El CS inhibe la proliferación a [1] y [2] mg/ML sin afectar la viabilidad celular de la línea celular leucémica J774 e induce una diferenciación de macrófagos (Córdova-Galaviz *et al.*, 2014).

Después de 48 h, el CS a [2] mg/ML, inhibe la proliferación de J774 y a 120 h decremента su viabilidad en comparación con Ara-C (Córdova-Galaviz *et al.*, 2014).

El CS y las caseínas  $\alpha$  y  $\kappa$  a [0.5] mg/mL y la  $\beta$ -caseína a [0.1] mg/ML, bloquean la proliferación celular de 32Dcl3, sin afectar la viabilidad celular y esta inhibición fue provocada por TNF- $\alpha$  (Weiss-Steider *et al.*, 2019)

Se demostró que la IC<sub>50</sub> de cita, dauno y CS en la línea celular WEHI-3 fue de: 17.8 μg/mL para cita, 5.7 ng/mL para dauno y 1.85 mg/mL para CS y para la IC<sub>25</sub> de cita, dauno y CS fueron: 8.9 μg/mL para cita, 2.85 ng/mL para dauno y 0.925 mg/mL para CS (Meléndez-Ibarra, 2019).

Las combinaciones de IC<sub>25</sub> de CS-cita y CS-dauno poseen un efecto sinérgico en la inhibición de células leucémicas WEHI-3, igualando la combinación cita-dauno que inhibió el 70% de esta línea celular (Meléndez-Ibarra, 2019).

Sobre CMN de MO de ratones sanos, se estimularon a las concentraciones de IC<sub>50</sub> e IC<sub>25</sub> anteriormente mencionadas, se demostró que las IC<sub>50</sub> e IC<sub>25</sub> de CS aumentaron su proliferación en más del 60 % en comparación con el control, mientras que la combinación cita-dauno disminuye su proliferación (Meléndez-Ibarra, 2019).

La β-caseína influencia a los linfocitos B vía TLR4 y linfocitos T CD8+ a la producción de histamina, IL-2 e IL-7 (Ledesma-Martínez *et al.*, 2020).

De acuerdo con Ledesma-Martínez en 2013, se estableció un modelo de leucemia de ratones BALB/c, los cuales, inocularon vía *i.p.* a  $1.0 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^5$  y  $1.0 \times 10^6$  células WEHI-3 / 500 μL y se dio un seguimiento para la supervivencia por 40 días, evidenciando que a  $1.0 \times 10^6$  se induce a la muerte antes de los 25 días y se requieren 10 días más para conseguir la misma mortalidad con las inoculaciones restantes, pero se decidió que a  $2.5 \times 10^5$  células WEHI-3 fuese el tamaño de inóculo para inducir el modelo de leucemia en ensayos posteriores.

Gidali *et al.* mostraron que células extraídas de la MO de ratones inoculados con células WEHI-3, son capaces de proliferar *in vitro* en ausencia de factores de crecimiento (como IL-3) (Gidali *et al.*, 2001). A partir del modelo establecido, Ledesma-Martínez inoculó vía *i.p.* dos grupos de ratones con  $2.5 \times 10^5$  células WEHI-

3 o solo vehículo (PBS) y a los días 1, 2, 3 y 10, se obtuvieron células mononucleares de MO (CMN-MO) de un ratón de cada grupo, respectivamente. Estas células se cultivaron por 120 h en ausencia y presencia de 5 ng/mL de rmIL-3 y se analizó la proliferación, evidenciando que tanto las CMN-MO con solo vehículo y las CMN-MO con células WEHI-3 a los días 1, 2 y 3, necesitan de la adición de rm-IL-3 para proliferar, pero si éstas últimas, son extraídas 10 días después, son capaces de proliferar en ausencia de rmIL-3 (Figura 7) (Ledesma-Martínez, 2013).

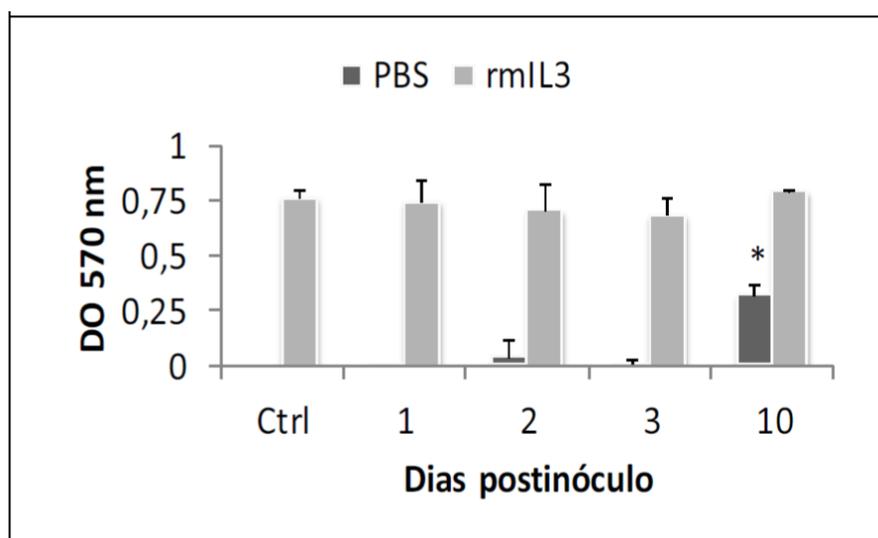


Figura 7. Proliferación de CMN de MO de ratones inoculados o no, con células WEHI-3 en ausencia o presencia de 5 ng/mL de rmIL-3 (PBS o rmIL-3 respectivamente). Cada punto representa la media +/- desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes. Significancia estadística \* $p < 0.05$  en el ANOVA Dunnet. Tomado de Ledesma-Martínez, 2013.

Posteriormente, ratones leucémicos fueron tratados vía *i.p.* cada 48 h con las dosis individuales más exitosas (véase tabla 12) (2 g/Kg para CS<sub>50</sub>, 3 mg/Kg para cita<sub>50</sub> y 0.5 mg/Kg para dauno<sub>50</sub>) o éstas, pero combinadas (CS<sub>50</sub>-cita<sub>50</sub>, CS<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> y cita<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub>) manejando seis grupos, más un control sano, un control WEHI-3 sin tratamiento y un control WEHI-3 tratado con solo vehículo (PBS). Se evidenció que cita<sub>50</sub>, vehículo y control WEHI-3 tienen una curva de supervivencia similar, pero no más de 38 días, la de CS<sub>50</sub> o dauno<sub>50</sub> es de 44 y 48 días respectivamente, sin embargo, las combinaciones alcanzaron supervivencia más prolongada; cita<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> tiene una sobrevivencia del 41% a los 40 días y de 0% a los 50 días; CS<sub>50</sub>-cita<sub>50</sub>

induce una sobrevida del 40% a los 40 días y se mantiene el 10% por más de 70 días; finalmente, CS<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> mostró una supervivencia del 85% a los 50 días y el 20% a los 70 días (Figura 8) (Meléndez-Ibarra, 2019).

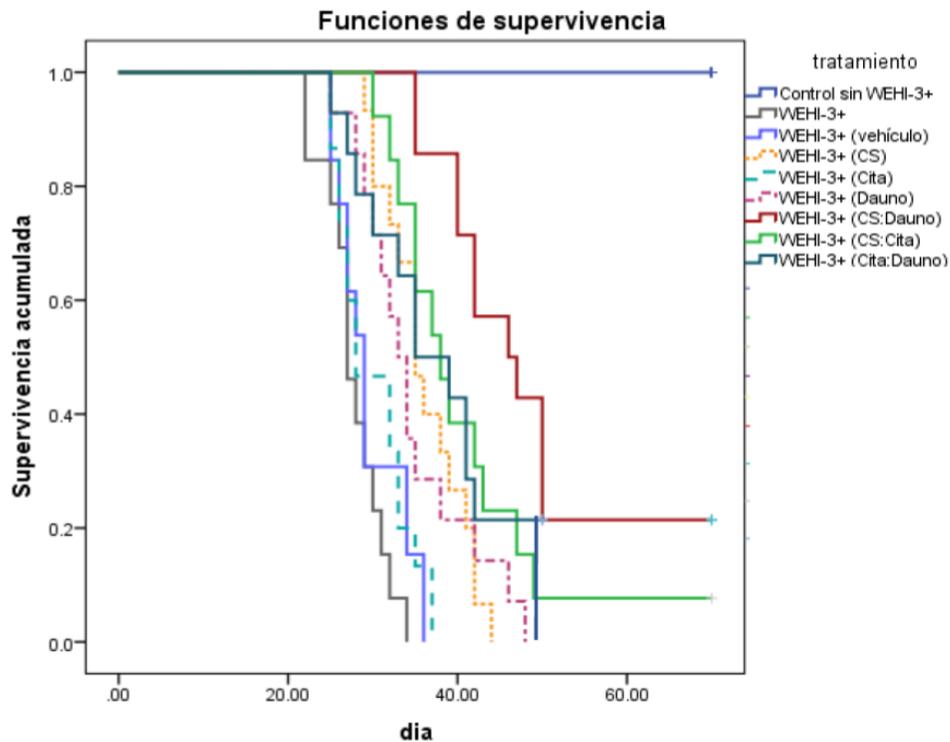


Figura 8. Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con daunorrubicina, citarabina o CS solos o combinados. Análisis de Kaplan Meier. Tomado de Meléndez-Ibarra, 2019.

Así mismo, a los 30 días de tratamiento, posterior a la inducción de células WEHI-3, se sacrificó un ratón de cada tratamiento para evaluar si las CMN-MO presentaban células proliferantes en ausencia de rmlL-3, Después de 120 h de cultivo en los tratamientos individuales como en los tratamientos combinados, proliferan en ausencia de IL-3, revelando así presencia de células leucémicas, sin embargo, en el tratamiento cita<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> no proliferaron aún con la adición de rmlL-3 indicando daño en la MO (Figura 9). Para los 60 días postratamiento se realizó el mismo procedimiento con los grupos sobrevivientes (CS<sub>50</sub>-cita<sub>50</sub> y CS<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub>). En ninguno de los dos grupos se observó células auto proliferantes, pero la adición de rmlL-3, a los cultivos de MO tratados con CS<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub> promovió la proliferación, sin embargo, en el tratamiento de CS<sub>50</sub>-cita<sub>50</sub> las células no proliferan aún con rmlL-

3, señal de daño a la MO (Figura 10) (Meléndez-Ibarra, 2019). En este trabajo se analiza si dichas combinaciones (CS<sub>50</sub>-cita<sub>50</sub> o CS<sub>50</sub>-dauno<sub>50</sub>) son efectivas en la erradicación de la leucemia en un modelo de ratón con leucemia avanzada.

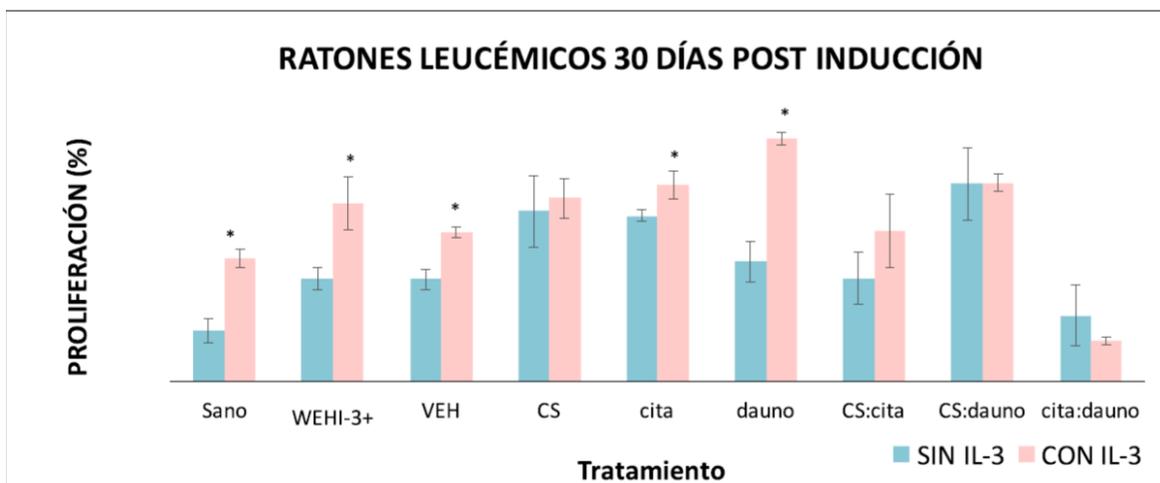


Figura 9. Proliferación de CMN de ratones leucémicos a los 30 días post inducción y tratamientos en ausencia o presencia de rmlL-3. Cultivados durante 120 h y evaluados por la técnica de cristal violeta. Significancia estadística \* $p < 0.05$  respecto al control sano con rmlL-3 en la prueba de Tukey. Tomado de Meléndez-Ibarra, 2019.

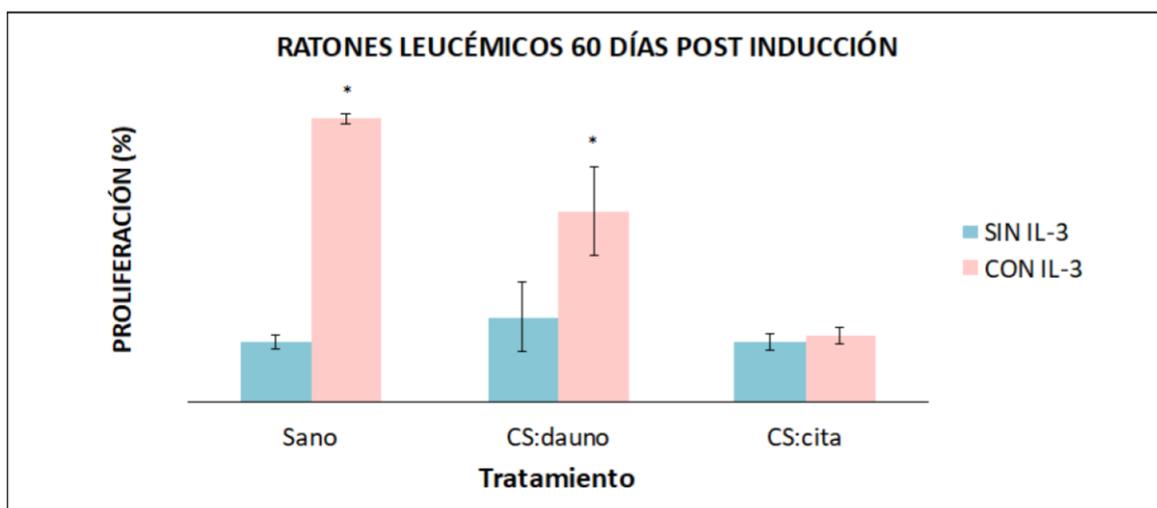


Figura 10. Proliferación de CMN de ratones leucémicos a los 60 días post inducción y tratamientos en ausencia o presencia de rmlL-3. Cultivados durante 120 h y evaluados por la técnica de cristal violeta. Significancia estadística \* $p < 0.05$  respecto al control sano con rmlL-3 en la prueba de Tukey. Tomado de Meléndez-Ibarra, 2019.

## 6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La administración de CS a ratones leucémicos prolonga la supervivencia hasta en un 40% y atenúa las manifestaciones de la enfermedad, pero, sin eliminar a las células auto proliferantes de la MO en ratones sobrevivientes (Córdova-Galaviz *et al.*, 2014; Ledesma-Martínez *et al.*, 2012). Recientemente se mostró, que el CS en combinación con daunorrubicina, proporcionan un efecto sinérgico, que elimina las células auto proliferantes de la MO de ratones con leucemia temprana a los 60 días posteriores al tratamiento (Meléndez-Ibarra, 2019). Sin embargo, no se sabe si esta combinación proporciona el mismo efecto sinérgico en un modelo de ratón con células auto proliferantes instaladas en MO como modelo de leucemia avanzada.

## 7. JUSTIFICACIÓN

La AML es una enfermedad de mayor prevalencia en adultos mayores y que a pesar de los avanzados tratamientos, sigue teniendo una tasa de supervivencia del 40% en adultos jóvenes y de solo 10% en adultos mayores (Döhner *et al.*, 2015; Bray *et al.*, 2018). Por lo que es necesario ofrecer nuevas alternativas de tratamiento. Recientemente se mostró que el CS en combinación con daunorrubicina, o citarabina eliminan a las células auto proliferantes de la MO de ratones leucémicos tempranamente tratados. Los pacientes con leucemia generalmente llegan con síntomas a causa de una leucemia avanzada; y, a pesar de las múltiples alternativas que los pacientes tienen a su disposición, se ha informado que los diferentes fármacos contienen efectos hepato- y cardiotóxicos, provocan mielosupresión y síndrome de lisis tumoral (Hwang *et al.*, 2019). Si se muestra que la combinación de CS-citarabina o CS-daunorubicina también lo hace en ratones con leucemia avanzada, se darán nuevas evidencias del valor de esta combinación para la erradicación de la leucemia esperando en un futuro pueda ser de gran valor clínico que permita prolongar la tasa de supervivencia de los pacientes.

## **8. HIPÓTESIS**

La administración combinada de CS con citarabina o daunorrubicina en un modelo de ratón con leucemia temprana, elimina a las células auto proliferantes de la MO de los ratones sobrevivientes a los 60 días postratamiento, parámetro que implica una posible cura para la AML, por lo anterior, la administración combinada de CS con citarabina o daunorrubicina en ratones con leucemia avanzada inoculados con células WEHI-3 promoverá la eliminación de células leucémicas auto proliferantes de la MO de los ratones sobrevivientes a los 60 días postratamiento.

## **9. OBJETIVOS**

### **9.1. GENERAL**

Evaluar el efecto antileucémico de CS en combinación con citarabina o daunorrubicina en ratones con leucemia avanzada inoculados con células WEHI-3.

### **9.2. PARTICULARES**

1. Establecer el tiempo en el que se detectan células con crecimiento autónomo, provenientes de MO de ratones inoculados con WEHI-3 como modelo de leucemia avanzada
2. Evaluar la eficacia del tratamiento combinado con CS-citarabina o CS-daunorrubicina para inducir supervivencia en ratones con leucemia avanzada
3. Evaluar si la administración combinada de CS-citarabina o CS-daunorrubicina en ratones leucémicos sobrevivientes a leucemia avanzada, carecen de células auto proliferantes

## 10. MATERIALES Y MÉTODO

### **Cultivo de líneas celulares**

Para este trabajo se empleó la línea de leucemia mielomonocítica WEHI-3 de ratón de la ATTC (American Type Culture Collection). Las células se cultivaron en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL, USA) y 1.5  $\mu\text{M}$  de  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo.) a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/mL a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con una expansión cada 48 h.

### **Animales**

El procedimiento que involucra animales se realizó 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 y la Guidelines For The Welfare and Use of Animals in Cancer Research. Se usaron ratones macho BALB/c de 8 a 12 semanas en condiciones libres de patógenos y alimentados con una dieta estándar de laboratorio, mantenidos con 12 h luz y 12 h oscuridad bajo temperatura controlada. Se alojaron en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.

### **Desarrollo de un modelo de leucemia avanzada en ratones BALB/c inducido con células WEHI-3**

En dos experimentos independientes, con doce ratones BALB/c cada uno, fueron trasplantados *i.p.* con  $2.5 \times 10^5$  células leucémicas WEHI-3 (con una viabilidad del 95%) en 200  $\mu\text{l}$  de PBS (solución estabilizadora de fosfatos) con 3% de SFB, mismas que provienen de la misma cepa.

### **Cultivo de células mononucleadas de médula ósea (CMN-MO)**

Doce ratones de la cepa BALB/c fueron trasplantados *i.p.* con  $2.5 \times 10^5$  células leucémicas WEHI-3 y posterior al trasplante, tres ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a los 0, 3, 6 y 9 días, en cada tiempo. Los fémures se obtuvieron en condiciones estériles y se arrastraron las células totales de MO, haciendo fluir IMDM (Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de SFB (Gibco, USA). Posteriormente se separaron las CMN-MO mediante un gradiente de densidad (Histopack densidad= $1.077 \text{ g mL}^{-1}$ ) (Sigma, St Louis, M), y por último se realizó un cultivo de las células en IMDM suplementado con 15% de SFB (Gibco BRL, USA), 5% de suero equino e interleucina-3 recombinante de ratón (rmlL-3) en placas de 96 pozos (Corning NY, USA). En el tiempo que se detectaron células auto proliferantes en MO, en ausencia de rmlL-3, se consideraron como modelos de leucemia avanzada.

### **Detección de células auto proliferantes provenientes de MO**

CMN-MO de ratones inoculados o no con células leucémicas WEHI-3, se obtuvieron como se indica previamente, cultivándose a una densidad de  $1 \times 10^5$  en ausencia o presencia de rmlL-3 como factor de crecimiento para revelar la presencia de células malignas auto proliferantes.

### **Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta**

El cultivo se mantuvo por 120 horas para las células mononucleadas de MO de ratón. Después del tiempo de incubación, la proliferación celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta modificada por Kueng (1989) y originalmente propuesta por Gillies *et al.* (1986). Las células se fijaron con glutaraldehído al 1% durante una hora, posteriormente se adiciono la solución de cristal violeta al 1.1%, agitando por diez minutos y se retiró el exceso de colorante con agua destilada; inmediatamente se agregaron 50 mL de ácido acético al 10% agitando durante 20 min, para solubilizar el colorante. La densidad óptica de las células se evaluó a 570 nm en un

espectrofotómetro de placas (SpectraTecan Image, Austria), y los datos obtenidos fueron graficados.

### **Tratamiento de ratones con leucemia avanzada**

El CS (Spectrum USA) se solubilizó en PBS y esterilizó por autoclave, preparando una solución patrón de 100 mg/mL. Por otro lado, se realizaron diluciones en PBS de  $\beta$ -D-arabinofuranosil citosina Número CAS: 147-94-4 (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) y clorhidrato de daunorrubicina Número CAS: 23541-50-6 (Sigma Aldrich) en función de las concentraciones de uso.

### **Evaluación de la supervivencia**

En dos experimentos independientes, se tomó el modelo de ratón con leucemia avanzada y se construyeron doce grupos experimentales con una n=4 cada uno como sigue: Control sano, Control +WEHI-3, Control+Vehículo (PBS) + WEHI-3, Cita<sub>25</sub> + WEHI-3, Cita<sub>50</sub> + WEHI-3, Dauno<sub>25</sub> + WEHI-3, Dauno<sub>50</sub> + WEHI-3, CS<sub>25</sub> + WEHI-3, CS<sub>50</sub> + WEHI-3, CS<sub>50</sub>-Cita<sub>50</sub> + WEHI-3, CS<sub>50</sub>-Dauno<sub>50</sub> + WEHI-3 y Cita<sub>50</sub>-Dauno<sub>50</sub> + WEHI-3. Se registraron los decesos cada 24 h y se graficaron por un análisis de Kaplan-Meier. En el día número 30 y 60 de tratamiento, un individuo de cada condición se sacrificó para extraer fémur y recuperación de células de MO.

### **Cultivo de células mononucleadas de médula ósea (CMN-MO) *in vivo***

Ratones BALB/c con leucemia avanzada tratados durante 30 y 60 días fueron sacrificados por dislocación cervical conforme a la NOM-062-ZOO-1999, posteriormente se obtuvieron ambos fémures. La epífisis fue perforada y haciendo fluir medio IMDM suplementado con 10 % de SFB se extrajeron las células totales de la MO. Posteriormente, se aislaron las células mononucleadas mediante gradiente de densidad empleando hystopaque (densidad=1.077 g/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). Llevándolas a un cultivo *in vitro* en placas de 96 pozos, en ausencia y presencia de rmlL-3 como factor de crecimiento exógeno y la

proliferación se evaluó a las 120 h por el procedimiento de cristal violeta indicado anteriormente.

### **Análisis de datos**

Todos los bioensayos se realizaron tres veces de manera independiente por cuadruplicado (en este caso, para las placas de 96 pozos). Los datos se presentaron como media desviación estándar y para determinar la diferencia significativa se aplicará un análisis de varianza (ANOVA), con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para obtener la diferencia significativa empleando el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., USA).

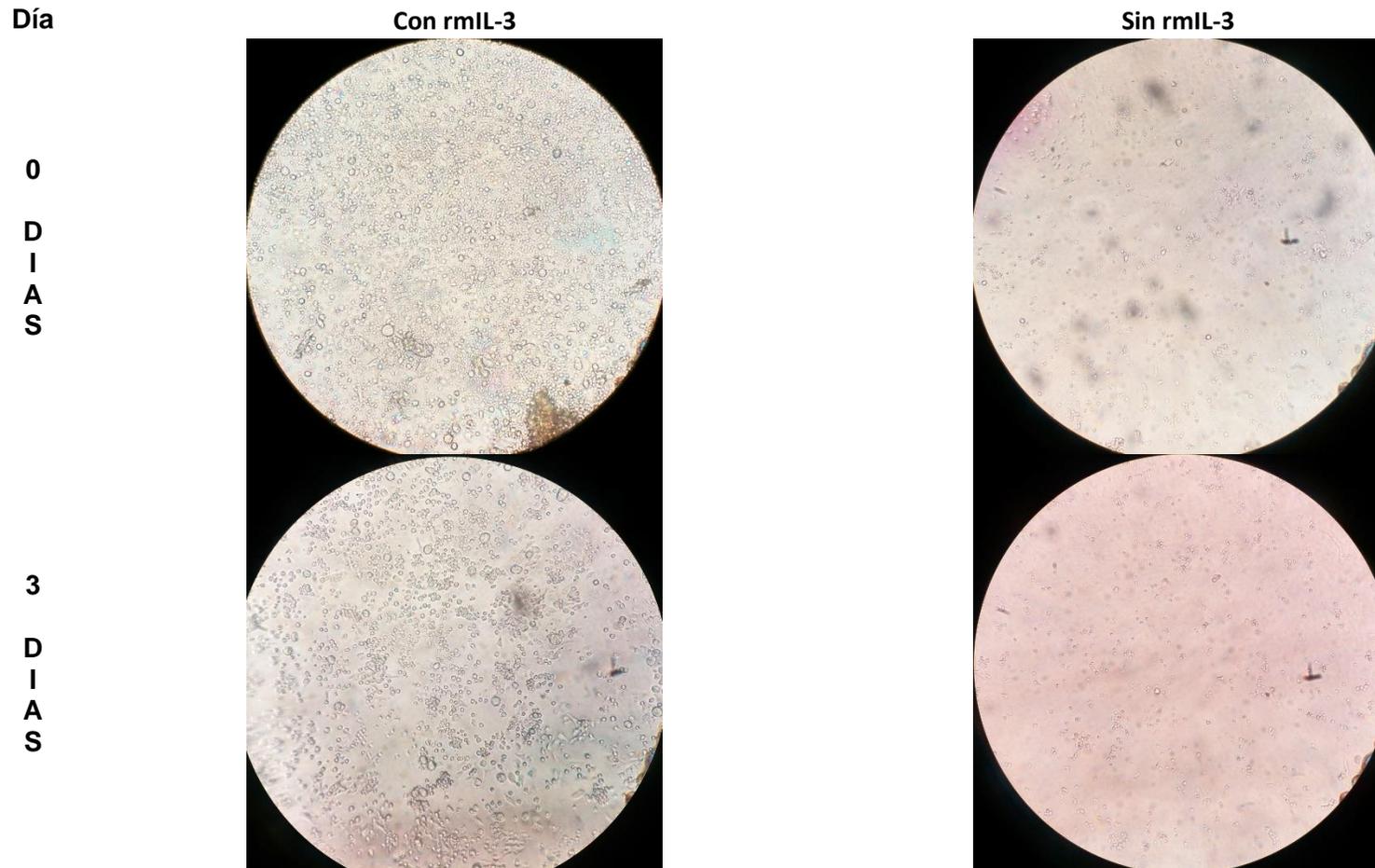
## 11. RESULTADOS

### **LAS CÉLULAS LEUCEMICAS WEHI-3 LOGRAN ESTABLECERSE EN MO DESDE LOS 6 DÍAS POST INÓCULO**

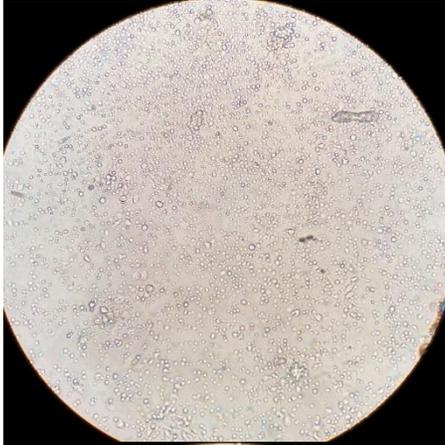
Se propuso establecer un modelo de leucemia aguda avanzada con células WEHI-3, para ello, se formaron cuatro grupos de tres ratones cada uno, todos inoculados con WEHI-3. Se obtuvieron células mononucleadas de MO de ratón a los 0 (Control), 3, 6 y 9 días de inoculación con WEHI-3, mismas que fueron cultivadas en presencia o no de rmlL-3 con el principio de ver si se encontraban ya establecidas las células auto proliferantes en la MO como indicativo de leucemia avanzada.

Para revelar si nuestro modelo de ratón BALB/c desarrolló AML avanzada, los cultivos se mantuvieron 120 h; pasado ese tiempo se observaron *in situ* (Figura 11). Y se evaluó la proliferación celular por la técnica de cristal violeta; encontrando así, que para los días 0 y 3 en presencia de rmlL-3 hay evidencia de proliferación celular, mientras que, en ausencia de rmlL-3 no. Para el día 6 se revela que existe un 3% de proliferación celular en ausencia de rmlL-3, probando así su establecimiento dentro de la MO y para el día 9 está proliferación es innegable con el 10% (Figura 12).

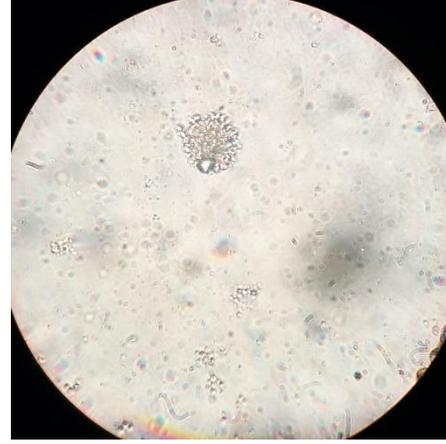
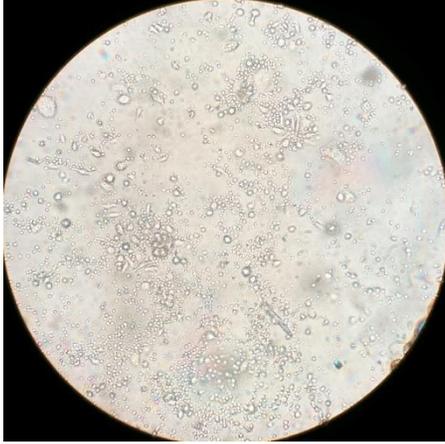
**Figura 11. Vista de células EN CULTIVO a los días 0, 3, 6 y 9 días post inóculo en ausencia y presencia de rmlL-3 a las 120 h a 40x**



6  
D  
I  
A  
S



9  
D  
I  
A  
S



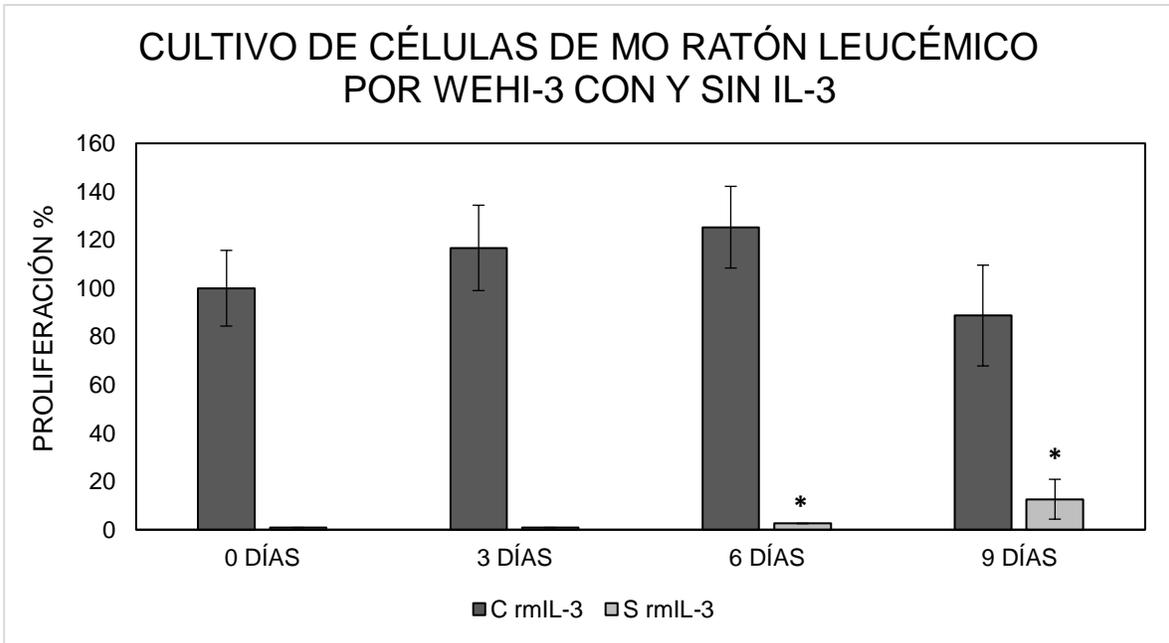


Figura 12. Ensayo de porcentaje de proliferación celular. Porcentaje de proliferación de células WEHI-3 en MO de ratón BALB/c a los 0, 3, 6 y 9 días posteriores del inóculo *i.p.* Cultivados durante 120 h en ausencia o presencia de rmlL-3 y evaluados por la técnica de cristal violeta. Significancia estadística \*  $p < 0.05$  respecto al control (0 días) sin rmlL-3 en la prueba de Tukey. *i.p.*: intraperitoneal, rmlL-3: Interleucina-3 recombinante de ratón.

# RATONES CON LEUCEMIA AVANZADA TRATADOS CON DIFERENTES DOSIS DE CS, CITARABINA O DAUNORRUBICINA SOBREVIVEN MÁS DÍAS QUE SIN TRATAMIENTO

## COMPUESTOS INDIVIDUALES

Ratones leucémicos inoculados vía *i.p.* y dejados 10 días para el desarrollo de la enfermedad, fueron tratados vía *i.p.* cada 48 h con las LD<sub>50</sub> individuales más exitosas de ensayos anteriores (2 g/Kg CS, 3 mg/Kg Cita y 0.5 mg/Kg Dauno) (Meléndez-Ibarra, 2019) y a éstas se añadieron 3 grupos más con las LD<sub>25</sub> del ensayo anterior (1 g/Kg CS, 1.5 mg/Kg Cita y 0.25 mg/Kg Dauno). Por lo cual se manejaron seis grupos, más un grupo control sano, un control WEHI-3+ sin tratamiento y un control WEHI-3+ tratado con PBS.

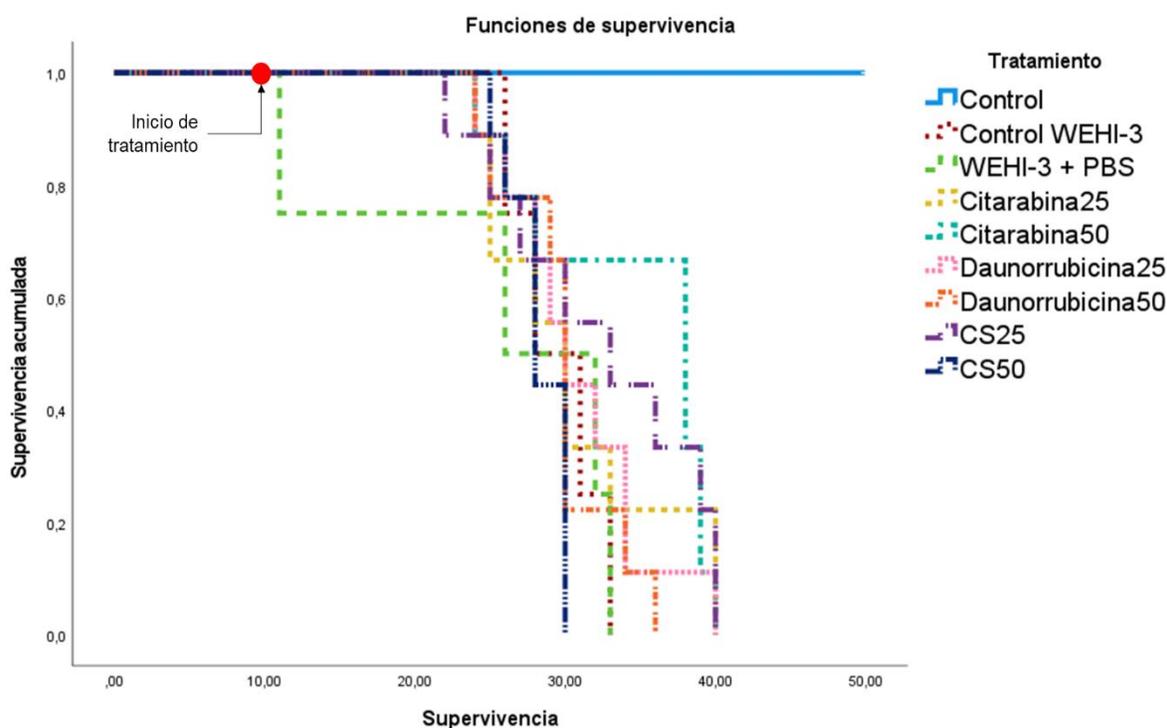


Figura 13. Supervivencia general de ratones con leucemia avanzada con compuestos independientes. Supervivencia de ratones leucémicos BALB/c inducidos con WEHI-3 y tratados 10 días después con: 1 mL de vehículo (WEHI-3 + PBS) y los compuestos: CS [2 g/Kg]; citarabina [3 mg/Kg] o daunorrubicina [0.5 mg/Kg] solos en PBS (10% p/v) cada 48 h. Análisis de Kaplan-Meier,  $n=4$  por grupo. CS: caseinato de sodio, PBS: solución estabilizadora de fosfatos.

Se encontró que CS<sub>50</sub> (azul rey) posee 75% de sobrevida para el día 25, pero para el día 30 la curva de sobrevivencia de este compuesto llega al 0% e inclusive es menor al Control WEHI-3 (rojo) y al Control WEHI-3 + PBS (verde) quienes tienen una curva de sobrevida del 50% al día 30 y antes de los 35 días, ya cuenta con el 0% de sobrevida. Por otro lado, el compuesto Daunorrubicina<sub>50</sub> (naranja) al día 30 posee una sobrevida del 60% y tiene una decaída del 20% que llega a un poco más de 35 días. El compuesto Citarabina<sub>25</sub> (amarillo) a los 30 días posee una sobrevida del 30% y antes de los 35 días baja a 20% que mantiene hasta los 40 días. Daunorrubicina<sub>25</sub> (rosa) a los 30 días posee una sobrevida de arriba del 40% sin embargo, a los 35 días posee una sobrevida del 15% que mantiene a los 40 días. Los compuestos individuales LD<sub>25</sub>: Citarabina<sub>50</sub> y CS<sub>25</sub> poseen una curva de sobrevida similar y que se alejan de la sobrevivencia de los compuestos antes mencionados. Mientras Citarabina<sub>50</sub> (turquesa) a los 30 días posee una sobrevida alta de más del 60%, este decae antes de los 40 días con un 15%; CS<sub>25</sub> (morado) a los 20 días tiene un 90% de sobrevida, a los 30 días posteriores a la inducción cuenta con arriba de 50% de sobrevida que se mantiene hasta los 35 días, para esa fecha (35 días) posee un 20% que se mantiene hasta los 40 días. Ambos compuestos demostraron ser los más eficaces pues mantienen una buena curva de sobrevida de los ratones hasta los 40 días (10 días de desarrollo de la enfermedad + 30 días de tratamiento) (Figura 13).

## COMPUESTOS COMBINADOS

Ratones leucémicos inoculados vía *i.p.* con células WEHI-3 y dejados 10 días para el desarrollo de la enfermedad, fueron tratados vía *i.p.* cada 48 h con las LD<sub>50</sub> individuales más exitosas, pero combinadas (2 g/Kg CS, 3 mg/Kg Cita y 0.5 mg/Kg Dauno) (Meléndez-Ibarra, 2019) por lo cual se manejaron tres grupos, más un grupo control sano, un control WEHI-3+ sin tratamiento y un control WEHI-3+ tratado con PBS.

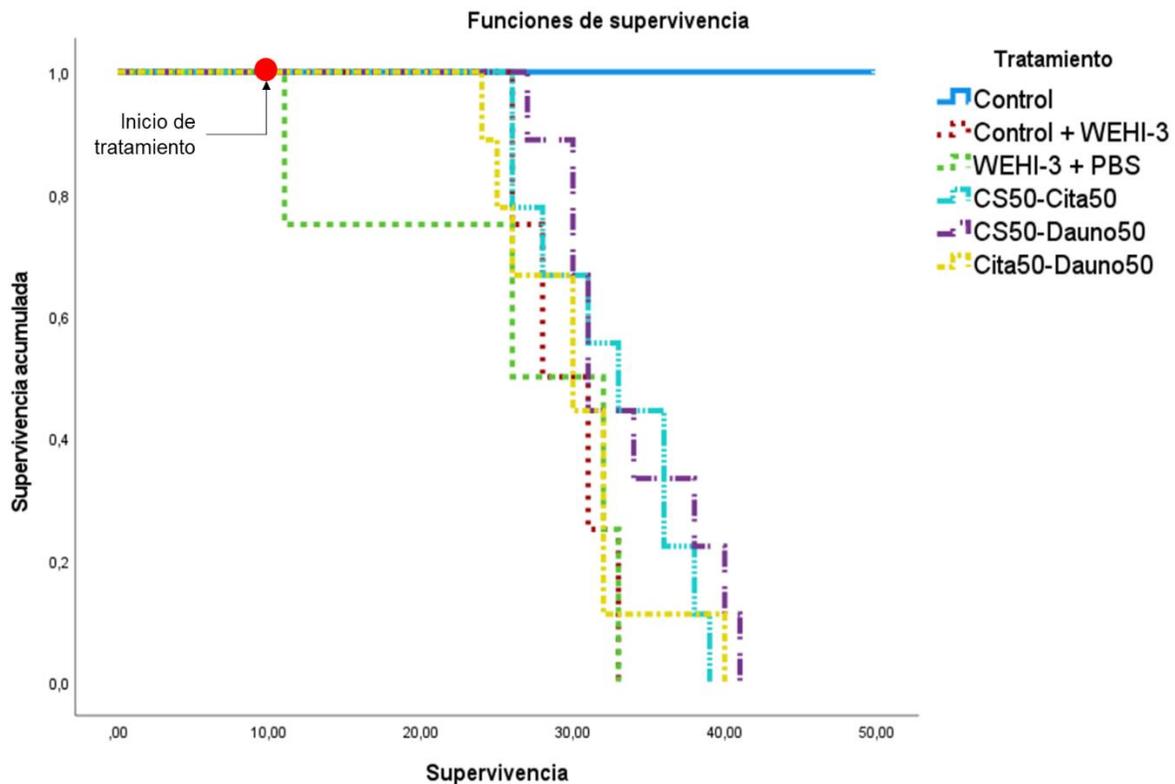


Figura 14. Supervivencia general de ratones con leucemia avanzada con compuestos combinados. Supervivencia de ratones leucémicos BALB/c inducidos con WEHI-3 y tratados 10 días después con: 1 mL de vehículo (WEHI-3 + PBS) y los compuestos: CS [2 g/Kg]; citarabina [3 mg/Kg] o daunorrubicina [0.5 mg/Kg] combinados en PBS (10% p/v) cada 48 h. Análisis de Kaplan-Meier,  $n=4$  por grupo. CS: caseinato de sodio, PBS: solución estabilizadora de fosfatos.

Encontramos que para Control WEHI-3 (rojo) y Control WEHI-3 + PBS (verde) tienen una curva de supervivencia del 50% al día 30 y antes de los 35 días, ya cuentan con el 0% de supervivencia. La combinación citarabina<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> (amarilla) después

de los 25 días posee una curva de supervivencia del 60% y para el día 30 del 50%, sin embargo, al día siguiente solo es del 10%, que logra mantenerse hasta el día 40. Los compuestos combinados CS<sub>50</sub>-citarabina<sub>50</sub> y CS<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> poseen una curva de supervivencia similar y que se alejan significativamente de los compuestos antes mencionados.; Mientras que CS<sub>50</sub>-citarabina<sub>50</sub> (turquesa) hasta el día 25 posee una supervivencia del 80%, al día 30 mantiene una supervivencia del 50%, cinco días después, cuenta con el 20% que no mantuvo hasta los 40 días. Por otro lado, CS<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> (morado) hasta los 25 días cuenta con una supervivencia del 90%, mientras que para el día 30 decae al 40% de supervivencia y a los 40 días posee el 20% de supervivencia que mantiene incluso después de esos 40 días (figura 14), demostrando la sinergia de los compuestos combinados para llevar más allá de 30 días la supervivencia de estos ratones como modelo de leucemia avanzada.

## **RATONES SOBREVIVIENTES A LOS 30 DÍAS POST TRATAMIENTO AÚN PRESENTAN CÉLULAS AUTO PROLIFERANTES EN MO**

Al día 40 después de la inducción de la leucemia (10 días de desarrollo de la enfermedad + 30 días de tratamiento) se sacrificó un ratón de cada uno de los grupos sobrevivientes para evaluar si la MO presentaba células auto proliferantes o no. Para ello, se obtuvieron células mononucleadas de MO de ratón, mismas que fueron cultivadas en presencia o no de rmlL-3 por 120 h; pasado ese tiempo se observaron *in situ* (Figura 15) y posteriormente, se evaluó la proliferación celular por la técnica de cristal violeta.

Se encontró que los tratamientos independientes que sobrevivieron al día 30 de tratamiento fueron: Citarabina<sub>25</sub>, Citarabina<sub>50</sub> y Daunorrubicina<sub>25</sub>, en donde, en presencia de rmlL-3 se promovió la proliferación de CMN de MO y también se observó la presencia de células auto proliferantes con la presencia e inclusive, en la ausencia de esta citocina (Figura 16), por otro lado, en el tratamiento Daunorrubicina<sub>25</sub> se ve un decremento inclusive en la adición de rmlL3 indicador de daño a la MO (Figura 16) confirmando una vez más el efecto tóxico de las antraciclina, pues éstas causan mielodepresión y poseen efectos cardiotóxicos (Wong & Lampkin, 1983; Henriksen, 2018).

**Figura 15: Vista in situ de células 40 días después del tratamiento (10 post inóculo + 30 días de tratamiento) a 10x. De dos experimentos independientes.**

Tratamiento

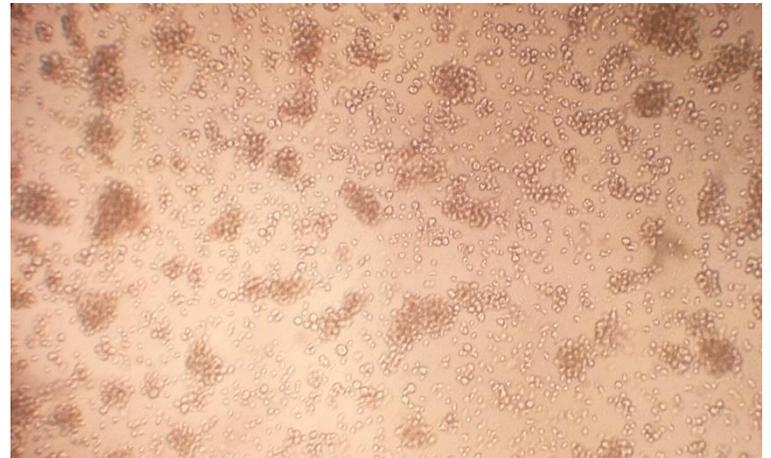
Sin rmlL-3

Con rmlL-3

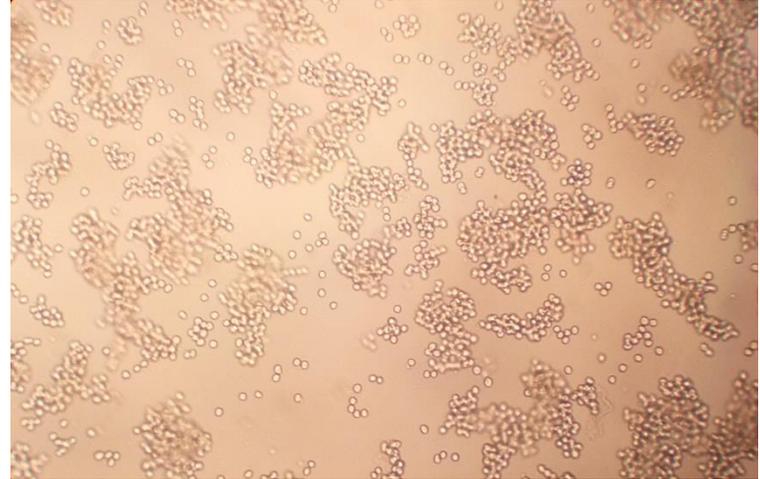
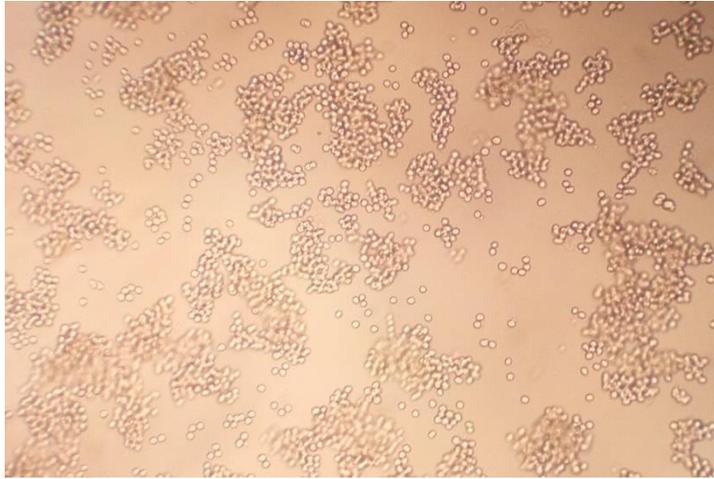
C  
T  
R  
L



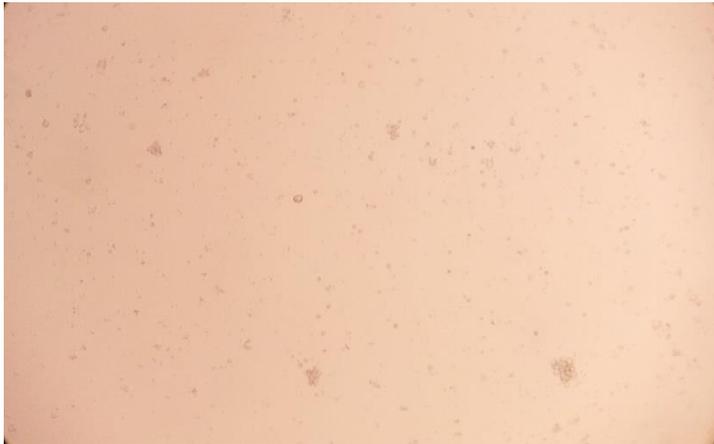
C  
I  
T  
A  
2  
5



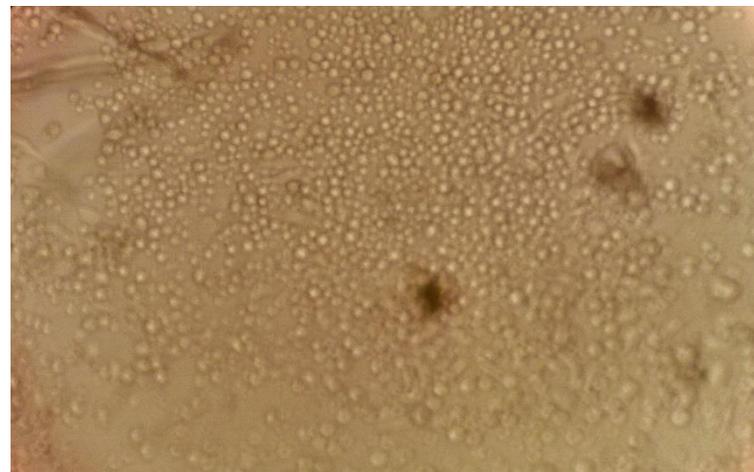
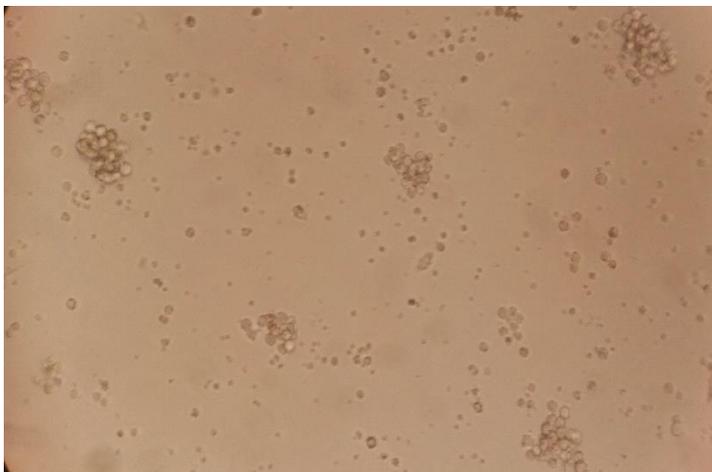
C  
I  
T  
A  
  
5  
0



D  
A  
U  
N  
O  
  
2  
5



C I T A 5 0 - D A U N O 5 0



C S 5 0 - D A U N O 5 0



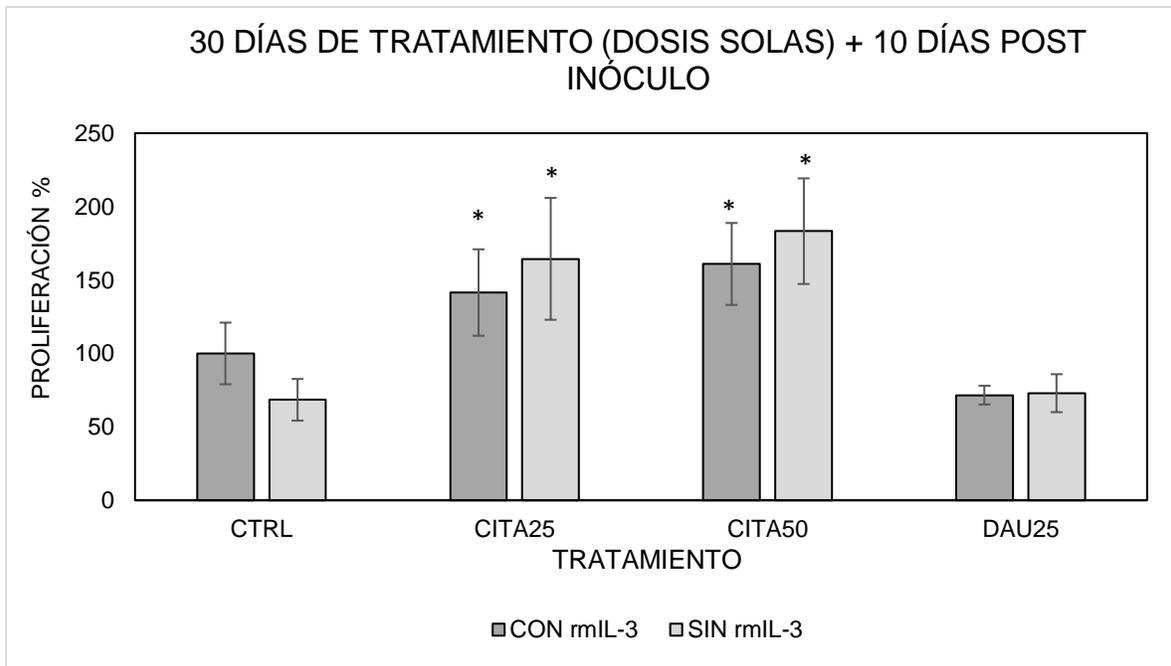


Figura 16. Porcentaje de proliferación de CMN-MO 40 días post inducción con tratamientos independientes. Proliferación de CMN-MO de ratones leucémicos a los 40 días post inóculo y tratamientos solos, en ausencia o presencia de rmlL-3. Cultivados durante 120 h y evaluados por la técnica de cristal violeta. Significancia estadística \*  $p < 0.05$  respecto al control (0 días) sin rmlL-3 en la prueba de Tukey. CMN-MO: células mononucleadas de médula ósea.

Del mismo modo, los dos únicos tratamientos de compuestos combinados que sobrevivieron al día 40 o más fueron: Citarabina<sub>50</sub>-Daunorrubicina<sub>50</sub> y CS<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub>, ambos grupos se observó células auto proliferantes y la adición de rmlL-3, a la MO de ratones de ambos grupos promovió la proliferación, aun así, en ambos tratamientos las células proliferan aún sin rmlL-3, señal de que la MO sigue invadida por células malignas (Figura 17). Con estos resultados se pudo confirmar que, a los 40 días, el tratamiento CS<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> es el más efectivo, ya que prolonga la sobrevida de los ratones en comparación con otros tratamientos solos o combinados, pero, aún hay presencia de células con crecimiento autónomo en la MO. Sin embargo, está combinación puede ser una ventaja al prolongar la vida de ratones con leucemia avanzada.

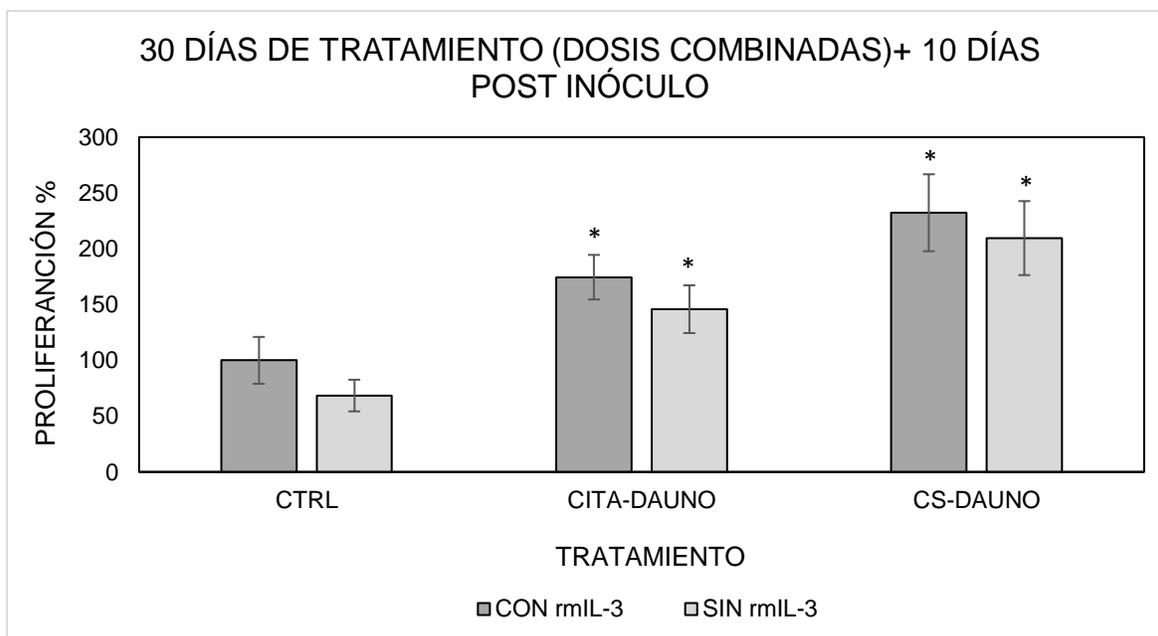


Figura 17. Porcentaje de proliferación de CMN-MO 40 días post inducción con tratamientos combinados. Proliferación de CMN-MO de ratones leucémicos a los 40 días post inóculo y tratamiento combinado, en ausencia o presencia de rmlL-3. Cultivados durante 120h y evaluados por la técnica de cristal violeta. Significancia estadística \*  $p < 0.05$  respecto al control (0 días) sin rmlL-3 en la prueba de Tukey. CMN-MO: células mononucleadas de médula ósea.

Al observar las tasas de supervivencia con los compuestos propuestos nos dimos a la tarea de ver la efectividad en concentraciones más pequeñas a las propuestas por Meléndez-Ibarra en 2019 (Ver tabla 12), para eso, se cultivó WEHI-3 estimuladas a diferentes concentraciones de CS, Citarabina y Daunorrubicina combinadas. Los resultados muestran la efectividad de inhibición en estas células al mostrar la misma efectividad si se combina CS con Citarabina o Daunorrubicina o si se combinan los tres fármacos (Figura 16).

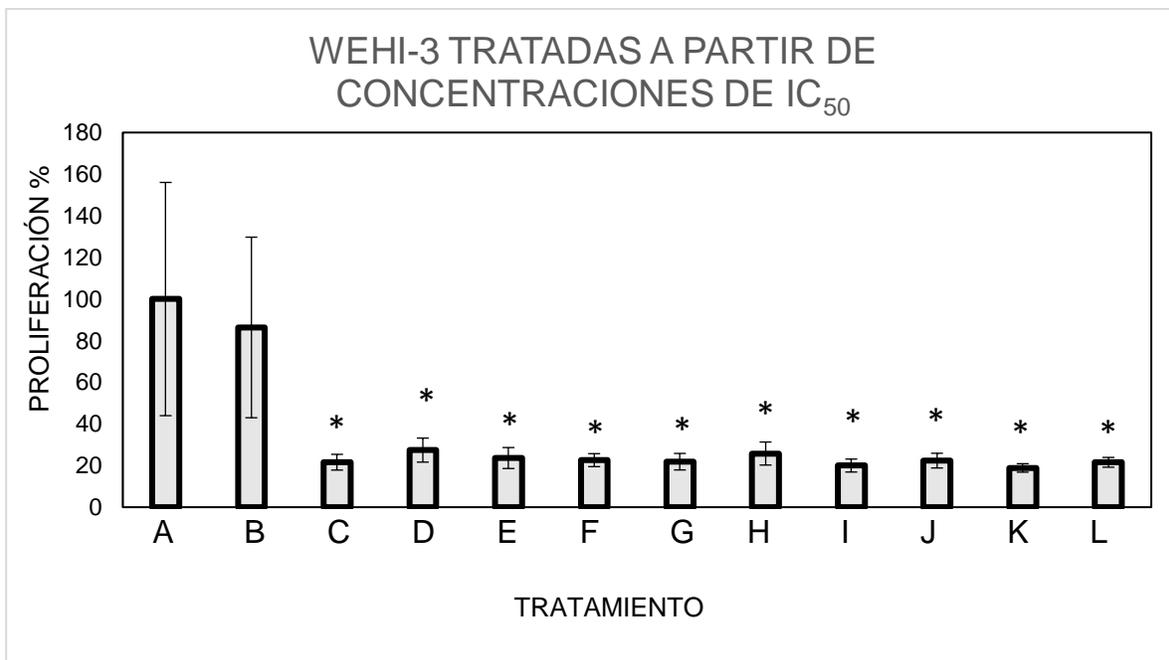


Figura 18. Porcentaje de inhibición inducida en células leucémicas WEHI-3. Inhibición de células leucémicas WEHI-3 con las IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> o IC<sub>12.5</sub> de CS, Citarabina o Daunorrubicina combinadas (propuestas por Meléndez-Ibarra en 2019). Cultivados durante 120 h y evaluados por la técnica de cristal violeta. Control (A), PBS (B), CS-Cita IC<sub>50</sub>:IC<sub>50</sub> (C), CS-Dauno IC<sub>50</sub>:IC<sub>50</sub> (D), CS-Cita IC<sub>25</sub>:IC<sub>25</sub> (E), CS-Dauno IC<sub>25</sub>:IC<sub>25</sub> (F), CS-Cita IC<sub>25</sub>:IC<sub>12.5</sub> (G), CS-Dauno IC<sub>25</sub>:IC<sub>12.5</sub> (H), CS-Cita-Dauno IC<sub>50</sub>:IC<sub>50</sub>:IC<sub>50</sub> (I), CS-Cita-Dauno IC<sub>25</sub>:IC<sub>25</sub>:IC<sub>25</sub> (J), CS-Cita-Dauno IC<sub>25</sub>:IC<sub>12.5</sub>:IC<sub>12.5</sub> (K) y CS-Cita-Dauno IC<sub>12.5</sub>:IC<sub>12.5</sub>:IC<sub>12.5</sub> (L). Significancia estadística \* p<0.05 respecto al control en la prueba de Tukey. CS: Caseinato de sodio, Cita: Citarabina, Dauno: Daunorrubicina, PBS: solución estabilizadora de fosfatos.

## 12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La AML es un grupo hematológico agresivo y heterogéneo de neoplasias que se caracteriza por una mayor proliferación de células progenitoras mieloides y una capacidad reducida para diferenciarse (Skayneh *et al.*, 2019), que resulta en una falla catastrófica de la MO (Illangesearan *et al.*, 2019). Desde 1970, el régimen de 7 días de citarabina infundida (100–200 mg / m<sup>2</sup> al día) más 3 días de una antraciclina (P. ej.: daunorubicina -60 o 90 mg / m<sup>2</sup>- en los días 1, 2 y 3 o idarubicina -10–12 mg / m<sup>2</sup>- en los días 1, 2 y 3) tiene como objetivo lograr la RC en pacientes <60 años, reduciendo drásticamente la carga de leucemia en los pacientes. Por otro lado, las personas mayores de 65 años tienen más probabilidades de presentar un perfil de riesgo citogenético adverso, con menos probabilidades de responder a la quimioterapia y, a menudo, más susceptibles a efectos relacionados con el tratamiento (De Kauchkovsky y Abdul-Hay 2016, Saultz y Garzon 2016; Short *et al.*, 2018; Illangesearan *et al.*, 2019).

Una vez que se origina la enfermedad, está evoluciona a un cuadro patológico con desenlace fatal en un periodo de días en ausencia de un tratamiento (Babu *et al.*, 2014; Leukaemia Foundation, 2020) y si el paciente es tratado, la recuperación es pobre; por ello, es importante manejar a los pacientes con un diagnóstico oportuno antes de que la enfermedad se vuelva agresiva; con la finalidad de reducir la mortalidad y prolongar la vida de éstos (Chatterjee *et al.*, 2013). Hasta ahora se sabe, que, posterior al diagnóstico: el 52% de los pacientes hombres <56 años, 57% de los pacientes hombres de entre 56 y 65 años, el 56% de los pacientes hombres de entre 66-75 años y el 55% de los pacientes hombres >75 años (el resto de los porcentajes corresponde a mujeres) llegan con AML producto de una invasión de la MO a causa de células leucémicas (Appelbaum *et al.*, 2006; American Cancer Society, 2018). Siguiendo estos pasos, para nuestro primer objetivo se planteó establecer el modelo de ratón con leucemia avanzada; y para esto, se utilizó el modelo de ratón con leucemia temprana que ha sido utilizado por más de cinco décadas (Warner *et al.*, 1969) y hasta la fecha ha dado resultados favorables en tratamientos para combatir la AML (Liao *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009;

Mohan *et al.*, 2010; Oran y Weisdorf, 2012). En virtud de nuestros resultados, este trabajo muestra que después de seis días de inoculación *i.p.* de células leucémicas WEHI-3 a ratones BALB/c; la MO ha sido invadida por dichas células y a nueve días esto es más evidente (Figura 12). Estos datos no pueden ser contrastados con literatura en virtud que no existen reportes de este tipo, sin embargo, Ledesma-Martínez en 2013 realizó el mismo trabajo revelando que a 10 días también es evidente la invasión de células leucémicas en MO de ratón; confirmando así el desarrollo de un nuevo modelo de ratón que puede ser utilizado para mejorar la efectividad de futuros tratamientos para combatir la AML. Es posible que un aumento de la densidad microvascular (MVD, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento vascular endotelial -VEGF-, iniciado por factores proangiogénicos derivados de las células tumorales implantadas en MO de ratón; activen una respuesta proinflamatoria en el microambiente provocando un crecimiento vascular irregular e incontrolado a causa de las células endoteliales modificadas por estas células leucémicas (Passaro *et al.*, 2017).

Actualmente se sabe que, a 5 cinco años, pacientes <60 años alcanzan una tasa de sobrevida del 35-45% y para pacientes ≥60 años, a 3 años es de solo 9-10% y a 5 años de 3-8% (Oran y Weisdorf, 2012; Saultz y Garzon, 2016; Behrmann *et al.*, 2018; Short *et al.*, 2018). En nuestro país se ha informado sobre la eficacia del régimen “7+3” (Citarabina + antraciclina), por ejemplo; Demichelis-Gómez y colaboradores en 2020 realizaron un análisis de enero de 2013 a diciembre de 2017 donde 525 pacientes con una media de edad de 47 años fueron diagnosticados con AML; de los cuales el 74.1% recibieron el régimen “7+3”. Con lo anterior, el 66% recibió daunorrubicina, el 20.7% recibió idarrubicina y 11.7% recibió mitoxantrona. Durante las primeras 6 semanas de tratamiento, se reportó una mortalidad del 10% en pacientes <60 años y una mortalidad del 24% en pacientes >60 años; con todos estos tratamientos se observó una RC del 71.3%, mientras que la tasa de mortalidad general ocurrió en el 17.8% de los casos. Posteriormente el 68.6% de los pacientes recibieron terapia de consolidación. La tasa de sobrevida promedio a 3 años fue del 34.8% con una mediana de 14 meses, sin embargo, una dosis baja de daunorrubicina (45 mg/m<sup>2</sup>) tiene una tasa de sobrevida de 9 meses, mientras que

una dosis alta de daunorrubicina ( $60-90 \text{ mg/m}^2$ ) tiene una mediana de 23.1 meses. En otro estudio realizado por Alvarado-Ibarra y colaboradores en 2018 realizaron un análisis a 204 pacientes con un promedio de edad de 39 años diagnosticados con AML que recibieron el esquema “7+3” donde la daunorrubicina fue administrada en 88 pacientes e idarubicina en 116 pacientes, mostrando una tasa de RC del 78% y una SG del 82%, mientras que la mortalidad fue del 12%. Así mismo 164 pacientes recibieron una primera terapia de consolidación y la mortalidad fue de 16%, mientras que 139 pacientes recibieron una segunda terapia de consolidación que terminó en un 17% de mortalidad. En México, los nuevos tratamientos para la AML, como gemtuzumab-ozogamicina, se han restringido debido a sus altos costos (Ruiz-Argüelles, 2016). La introducción de allo-HSCT con acondicionamiento de intensidad reducida de forma ambulatoria se asocia con resultados favorables de AML. Ha habido más de 20 años de experiencia en el trasplante de MO en México, que se ha reproducido en otros países en desarrollo, mejorando así el pronóstico de los pacientes con AML, principalmente en trasplantes realizados durante la primera RC. El conocimiento adquirido en México con respecto a la leucemia aguda ha demostrado un mal pronóstico, que también se ha descrito en otras poblaciones en todo el mundo (Ruiz-Argüelles, 2016). Con la seguridad de tener nuestro modelo de leucemia avanzada en ratón BALB/c, se prosiguió a la administración de los fármacos: CS, Citarabina y Daunorrubicina solos o combinados. Nuestros resultados muestran que los fármacos solos más efectivos administrados por treinta días fueron: Citarabina<sub>50</sub> (con un 15% de sobrevida a los 40 días) y CS<sub>25</sub> (con un 20% de sobrevida a los 40 días) sobre los otros fármacos solos administrados; demostrando tener una buena curva de sobrevivencia hasta los 40 días (10 días de desarrollo de la enfermedad + 30 días de tratamiento) (Figura 13). Y se esperaba que dichos fármacos combinados dieran buenos resultados en comparación con el tratamiento convencional de citarabina + antraciclina “7+3”, sin embargo, al combinar los fármacos nuestros resultados muestran que: CS<sub>50</sub>-citarabina<sub>50</sub> solo mantiene un 20% de sobrevida antes de los 40 días, pero CS<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> a los 40 días posee el 20% de sobrevida que mantiene incluso después de esos 40 días (figura 14), demostrando la sinergia de los compuestos combinados para llevar más allá de

30 días la supervivencia de éstos ratones como modelo de leucemia avanzada, lo que podría ser una ventaja significativa en cuanto a tratamientos de AML avanzada se refiere. En múltiples trabajos se habla sobre la efectividad de ciertos compuestos que muestran la supervivencia de los ratones en un modelo de leucemia temprana, por ejemplo: Meléndez-Ibarra en 2019 evidenció que las combinaciones CS<sub>50</sub>-citarabina<sub>50</sub> induce una sobrevida del 40% a los 40 días y se mantiene el 10% por más de 70 días y CS<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> mostró una supervivencia del 85% a los 50 días y el 20% a los 70 días. Por otro lado, Ledesma-Martínez y colaboradores en 2012 mostraron la efectividad del CS en un modelo de ratón con WEHI-3, donde CS posee una tasa de sobrevida del 40% a más de 40 días. Así mismo, Córdova-Galaviz y colaboradores en 2014 diseñaron un modelo de ratón con la línea celular J774 y demostraron que el CS lleva la sobrevida de los ratones con leucemia temprana con un 50-60% de sobrevida a más de 200 días en contraste con los tratados con citarabina (ARA-C). Estos trabajos demuestran que el CS prolonga la sobrevida de los ratones con la enfermedad en un estado temprano. También se ha estudiado el efecto de otros compuestos, por ejemplo: Lu y colaboradores en 2012 presentaron la efectividad del fitoquímico MJ-29 (un compuesto encontrado en hierbas medicinales que actúa como supresor del cáncer) en un modelo de ratón inoculado con WEHI-3 en donde se mostró que el compuesto en una dosis de (10 mg/kg) lleva la sobrevida de los ratones hasta el día 27, mientras que una dosis de (20 mg/kg) lleva una curva de sobrevida de 28 días, en otro estudio llevado a cabo por Yi y colaboradores en 2013, probaron la efectividad de un tratamiento antisuero CD176 (ya que el 70%-80% de células cancerígenas poseen CD176 en la superficie celular) en donde evaluaron una vacuna en ratones con leucemia que demostró que en comparación con el grupo control, la supervivencia del grupo se prolongó 7 días más (día 40) y se incrementó la supervivencia en un 32.8%. Otro estudio, realizado por Chen y colaboradores en 2017 probaron la efectividad de una vacuna que incluía un cebador para el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-SCF) en la sobrevida de ratones con leucemia y tratados inmediatamente después de la inducción, dando como resultado que esta vacuna prolonga la sobrevida de los ratones hasta en un 20% a 50 días posteriores de la inducción. Anteriormente se ha

demostrado que CS induce a la producción de citocinas como la G-SCF (Domínguez-Meléndez *et al.*, 2012) lo que abre una ventana de posibilidades y que es una gran ventaja a nuestro trabajo porque el desarrollo de un nuevo modelo de ratón que trata la enfermedad con síntomas de leucemia avanzada, demuestra el potencia de la combinación de los compuestos CS<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> al mantener una buena curva de sobrevida sobre el régimen citarabina<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> que prolonga la vida de los ratones con leucemia avanzada a más de 30 días posteriores del tratamiento.

Una vez que los ratones cumplían 30 días de tratamiento más 10 días de inoculó de células auto proliferantes, se obtuvieron CMN-MO que fueron cultivadas o no con rmlL-3, con la finalidad de comprobar si la MO aún poseía carga celular leucémica. Los tratamientos independientes que sobrevivieron al día 30 post tratamiento fue: Citarabina<sub>25</sub>, Citarabina<sub>50</sub> y Daunorrubicina<sub>25</sub>, en donde, en presencia y ausencia de rmlL-3 se promovió la proliferación de CMN-MO y también de células auto proliferantes (Figura 16). Pero en el caso de Daunorrubicina<sub>25</sub> no hay proliferación de CMN-MO confirmando el potencial tóxico de esta antraciclina hacia las células normales de MO (Wong & Lampkin, 1983; Henriksen, 2018). Los dos tratamientos combinados que sobrevivían al día 30 postratamiento son: citarabina<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> y CS<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub>; en ambos grupos se observó, de igual forma, la proliferación de CMN-MO y células auto proliferantes en presencia y ausencia de esta citocina, señal de daño en la MO (Figura 17). Meléndez-Ibarra en 2019, al día 30 posterior a la inducción de leucemia temprana, evaluó si la MO aún presentaba células proliferantes en ausencia de rmlL-3 encontrando que tanto en los grupos individuales como en las dosis combinadas las células proliferan en ausencia de rmlL-3, revelando así, la presencia de células leucémicas, cabe destacar, que en tratamiento citarabina<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub>, se encontró que no proliferaron aún con la adición de rmlL-3, indicando así, el daño a la MO. Para el día 60 posterior a la inducción de la leucemia temprana, Meléndez-Ibarra en 2019, encontró que en los únicos dos grupos sobrevivientes (CS-citarabina<sub>50</sub> y CS-daunorrubicina<sub>50</sub>) se observó proliferación de células auto proliferantes, pero la adición de rmlL-3 en el tratamiento de CS-daunorrubicina<sub>50</sub> promovió la proliferación

de células normales, pero, en el tratamiento CS-citarabina<sub>50</sub> las células no proliferan aún con rmlL-3, señal de daño en la MO.

Se puede decir entonces, que, en contraste con las dosis solas, los tres tratamientos sobrevivientes a los 30 días de tratamiento presentan daño en la MO, tal como lo reporto Meléndez-Ibarra en 2019, y para las dosis combinadas, tanto CS-citarabina<sub>50</sub> y citarabina<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub>, se observa el evidente daño en la MO producto de la carga de células leucémicas. Sin embargo, el tratamiento CS-daunorrubicina<sub>50</sub> fue el más exitoso, pues elevó la tasa de sobrevida de los ratones más allá de 40 días, sin embargo, es evidente el daño presente en la MO a causa de las células auto proliferantes. Recordemos que Meléndez-Ibarra en 2019 demostró que está dosis a los 30 días postratamiento aún poseía una carga leucémica, sin embargo, a los 60 días este, ya no presentaba esa carga de células auto proliferantes. Es probable que la carga de células con crecimiento autónomo y la inducción del tratamiento induzca a la producción de granulopoyesis en la combinación CS<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> como anteriormente se había reportado (Ramos-Mandujano *et al.*, 2008: Meléndez-Ibarra, 2019) haciendo que se tengan poblaciones de células normales y malignas. Debido a la citotoxicidad de los antineoplásicos para el actual tratamiento de los pacientes (Hwang *et al.*, 2019) es factible que las dosis citarabina<sub>25</sub>, citarabina<sub>50</sub> y citarabina<sub>50</sub>-daunorrubicina<sub>50</sub> no provoquen la muerte total de las células leucémicas para erradicarlas, sino que, además de esto, provocan un significativo daño al modular el microambiente de la MO (Kumar *et al.*, 2018).

Con los datos obtenidos hasta ahora, se sabe que los ratones AML avanzada sobreviven a no más de 40 días (10 días de inducción + 30 días de tratamiento) en comparación con lo reportado por Meléndez-Ibarra en 2019, donde se demostró que las combinaciones de CS-daunorrubicina<sub>50</sub> y CS-citarabina<sub>50</sub> erradican las células leucémicas de MO y las tasas de sobrevida van a más de 2 meses. En 2018 se comprobó la efectividad de CPX-351, un nuevo tratamiento liposomal de citarabina-daunorrubicina en relación 5:1 en donde se encontró que las bajas dosis aumentan la tasa de sobrevida de los pacientes (Lancet *et al.*, 2018) nosotros reportamos que

las bajas dosis de CS, citarabina y daunorrubicina prolongan estas tasas de supervivencia todavía más en comparación con las dosis reportadas (Lancet, *et al.*, 2018; Meléndez-Ibarra, 2019). Lo que podría abrir el camino a la inducción de fármacos (en este caso CS) en bajas dosis. Ante esta incertidumbre, realizamos un experimento *in vitro* de la eficacia de estas combinaciones bajo células leucémicas demostrando que las dosis bajas de CS son igual de efectivas en la inhibición de la proliferación a como si se pusiese en dosis de IC<sub>50</sub> reforzando así la aplicación en la inhibición de estas células leucémicas (Ramos-Mandujano *et al.*, 2008; Ledezma-Martínez *et al.*, 2012; Córdova-Galaviz *et al.*, 2014; Meléndez-Ibarra, 2019).

### **13. CONCLUSIÓN**

Nuestro modelo de ratón con leucemia avanzada a partir de la línea celular WEHI-3 logra establecerse en la MO a partir de los 6 días debido a la detección de estas mediante su proliferación en ausencia de citocinas exógenas.

Por otro lado, la combinación CS-daunorrubicina<sub>50</sub> o CS-citarabina<sub>50</sub> fueron las más efectivas para llevar más allá la supervivencia de los ratones con leucemia avanzada tratados con estas combinaciones con más del 40% a los 33 días de desarrollo de la enfermedad, en cambio, los demás tratamientos solo alcanzaron una supervivencia del 10% en los días antes mencionados. La supervivencia prolongada, no se correlaciona con la eliminación de células leucémicas, lo que es una ventana de tiempo relevante para explorar nuevas opciones de tratamiento.

## 14. REFERENCIAS

1. Alkhazraji, A, Elgamal, M, Ang, S. H, & Shivarov, V, "All Cancer Hallmarks Lead to Diversity," *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 12(1), 132-157, 2019
2. Alvarado-Ibarra, M, Guerra-Alarcón, L. V, Mena-Zepeda, V, Ortiz-Zepeda, M, Espitia-Ríos, E, Álvarez-Vera, J. L, De la Peña-Celaya, A and López-Hernández, M. A, "Frontline Treatment of Acute Myeloid Leukemia in Adults Long-Term Results in a Mexican Medical Center," *Cancer Therapy and Oncology International Journal*, 10(5): 86-94, 2018.
3. American Cancer Society, "Signos y Síntomas de la LLC," American Cancer Society, 2018, recuperado de: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-cronica/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-sintomas.html>
4. Antoniani, C, Romano, O, and Miccio, A, "Concise Review: Epigenetic Regulation of Hematopoiesis: Biological Insights and Therapeutic Applications," *Stem cells translational medicine*, 6(12), 2106-2114, 2017.
5. Appelbaum, F. R, Gundacker, H, Head, D. R, Slovak, M. L, Willman, C. L, Godwin, J. E, Anderson, J. E, & Petersdorf, S. H, "Age and Acute Myeloid Leukemia," *Blood*, 107(9), 3481–3485, 2006.
6. Arber, D. A, Attilio, O, Hasserjian, R, Thiele, J, Borowitz, M. J, Le Beau, M. M, Bloomfield, C. D, Cazzola, M & Vardiman, J. W, "The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia," *Blood* 127(20): 2391–2405, 2016.

7. Avni, B & Koren-Michowitz, M, "Myeloid Sarcoma: Current Approach and Therapeutic Options," *Therapeutic advances in hematology*, 2(5), 309–316, 2011.
8. Babu, S. K, Kashyap, V, Sivaranjani, P & Agila, S, "An Undiagnosed Case of Acute Myeloid Leukemia," *Journal of indian society of Periodontology*, 18(1), 95, 2014.
9. Ballaun, C, "Interleukin-14," *Cytokines*, 217–219, 1998.
10. Baveye, S, Ellass, E, Mazurier, J, Spik, G & Legrand, D, "Lactoferrin: A Multifunctional Glycoprotein Involved in the Modulation of the Inflammatory Process. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 37(3), 281–286, 1999.
11. Behrmann, L, Wellbrock, J, & Fiedler, W, "Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche—Take a Closer Look," *Frontiers in oncology*, 8, 444, 2018.
12. Boulais, P. E, & Frenette, P. S, "Making Sense of Hematopoietic Stem Cell Niches," *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(17), 2621-2629, 2015.
13. Bradstock, K. F, Matthews, J. P, Lowenthal, R. M, Baxter, H, Catalano, J, Brighton, T, Gill, D, Eliadis, P, Joshua, D, Cannell, P, Schwarzer, A. P, Durrant, S, Gillett, A, Koutts, J, Taylor, K, Bashford, J, Arthur, C, Enno, A, Dunlop, L, Szer, J, Leahy, M, Juneja, S & Young, G. A. R, "A Randomized Trial of High Versus Conventional Dose Cytarabine in Consolidation Chemotherapy for Adult *de novo* Acute Myeloid Leukemia in First Remission After Induction Therapy Containing High-Dose Cytarabine," *Blood*; 105 (2): 481–488, 2005.

14. Branton, M. H, & Kopp, J. B, "TGF-Beta and Fibrosis," *Microbes and infection*, 1(15), 1349–1365, 1999.
15. Bray, F, Ferlay, J, Soerjomataram, I, Siegel, R. L, Torre, L. A & Jemal, A, "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424, 2018.
16. Bydlowski, S. P, Levy, D, Ruiz, J. M, & Pereira, J, "Hematopoietic Stem Cell Niche: Role in Normal and Malignant Hematopoiesis," *Stem Cell Biology in Normal Life and Diseases*, 17, 2013.
17. Camacho, V, McClearn, V, Patel, S & Welner, R. S, "Regulation of Normal and Leukemic Stem Cells Through Cytokine Signaling and the Microenvironment," *International Journal of Hematology* 105, 566–577, 2017.
18. Catalan-Dibene, J, McIntyre, L. L & Zlotnik, A, "Interleukin 30 to Interleukin 40," *Journal of interferon and cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 38(10), 423–439, 2018.
19. Chang, Y. H, Yang, J. S, Yang, J. L, Wu, C. L, Chang, S. J, Lu, K. W, Lin, J. J, Hsia, T. C, Lin, Y. T, Ho, C. C, Wood, W. G & Chung, J. G, "Ganoderma Lucidum Extracts Inhibited Leukemia WEHI-3 Cells in BALB/c Mice and Promoted an Immune Response *in vivo*," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(12), 2589-2594, 2009.
20. Chatterjee, T, Gupta, S, Sharma, A, Sharma, S & Gupta, D, "Acute Panmyelosis with Myelofibrosis - A Rare Subtype of Acute Myeloid Leukemia," *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 5(1), 2013.

21. Chen, J, Zhang, M, Zhou, F, Wang, J, Niu, B & Zhang, W, "Immunological Effects of Vaccines Combined with Granulocyte Colony-Stimulating Factor on a Murine WEHI-3 Leukemia Model," *Oncology Letters*, 13(4), 2323-2329, 2017.
22. Cheng, H, Zheng, Z, & Cheng, T. "New Paradigms on Hematopoietic Stem Cell Differentiation," *Protein and cell*, 1(11), 34-44, 2019.
23. Chiou, B & Connor, J. R, "Emerging and Dynamic Biomedical Uses of Ferritin," *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 11(4), 124, 2018.
24. Colunga-Pedraza, P. R, Gómez-Cruz, G. B, Colunga-Pedraza, J. E & Ruiz-Argüelles, G. J, "Geographic Hematology: Some Observations in Mexico," *Acta haematologica*. 140(2), 114-120, 2018.
25. Córdova-Galaviz, Y, Ledesma-Martínez, E, Aguiñiga-Sánchez, I, Soldevila-Melgarejo, G, Soto-Cruz, I, Weiss-Steider, B & Santiago-Osorio, E, "Sodium Caseinate Induces Increased Survival in Leukaemic Mouse J774 Model" *In Vivo*, 28(5), 819-825, 2014.
26. Davis, A. S, Viera, A. J & Mead, M. D, "Leukemia: An Overview for Primary Care," *American family physician*, 89(9), 731-738, 2014.
27. De Kouchkovsky, I & Abdul-Hay, M, "Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Review and 2016 Update," *Blood cancer journal*, 6(7), 2016.
28. De La Garza, A, Sinha, A & Bowman, T. V, "Concise Review: Hematopoietic Stem Cell Origins: Lessons from Embryogenesis for Improving Regenerative Medicine," *Stem cells translational medicine*, 6(1), 60-67, 2017.

29. Demichelis-Gómez, R, Zapata-Canto, N, Leyto-Cruz, F, Terreros-Muñoz, E, Carrillo, A, Montaña-Figueroa, E, Solís-Poblano, J. C, Colunga-Pedraza, P, Díaz-Vargas, G, Amador-Medina, L. F, Martínez-Hernández, R, Turrubiates, F, Cabrera-García, A, Zaragoza, Espinoza, R, Gutiérrez-Serdán, R, Apodaca, E, Moreira, C, García-Castillp, C, García-Stivalet, L, Limón, A, Gómez-Almaguer, D, Rozen-Fuller, E, Espinosa-Bautista, K. A, Crespo-Solís, E & Meillón, L, "Acute Myeloid Leukemia in Mexico: The Specific Challenges of a Developing Country. Results from a Multicenter National Registry," *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 20(6), 295-303, 2020.
30. Döhner, H, Weisdorf, D. J & Bloomfield, C. D, "Acute Myeloid Leukemia," *New England Journal of Medicine*, 373(12), 1136-1152, 2015.
31. Domínguez-Meléndez, V, Aguiñiga-Sánchez, I, Moreno-Fierros, L, Torres, B & Santiago-Osorio, E, "El Caseinato de Sodio Incrementa el Número de Linfocitos B en Ratones," *Biomédica*, 37(4), 571-576, 2017.
32. Domínguez-Meléndez, V, Silvestre-Santana, O, Moreno-Fierros, L, Aguiñiga-Sánchez, I, Ledesma-Martínez, E, Marroquin-Segura, R, García-Hernández, A. L, Weiss-Steider, B, Marché-Cova, A, Monroy-García, A, Mora-García, L & Santiago-Osorio, E, "Sodium Caseinate Induces Mouse Granulopoiesis," *Inflammation Research*, 61(4), 367-373, 2012.
33. Dufva, O, Kankainen, M, Kelkka, T, Sekiguchi, N, Awad, A. A, Eldfors, S, Yadav, B, Kuusanmäki, H, Malani, D, Andersson, E. I, Pietarinen, P, Saikko, L, Kovanen, P. E, Ojala, T, Lee, D. A, Loughran Jr, T. P, Nakazawa, H, Suzumiya, J, Suzuki, R, Hye Ko, Y, Kim W. S, Chuang, S. S, Aittokallio, T, Chan, W. C, Ohshima, K, Ishida, F & Mustjoki, S, "Aggressive Natural Killer-Cell Leukemia Mutational Landscape and Drug Profiling Highlight JAK-STAT Signaling as Therapeutic Target," *Nature Communications*, 9(1), 1-12, 2018.

34. Ekmekcioglu, S, Kurzrock, R & Grimm, E. A, "Hematopoietic Growth Factors and Cytokines," *The Molecular Basis of Cancer* (pp. 605-619). Elsevier Inc., 2008.
35. Estey, E. H, "Acute Myeloid Leukemia: 2019 Update on Risk-Stratification and Management," *American journal of hematology*, 93(10), 1267-1291, 2018.
36. Farc, O, & Cristea, V, "Pro and Antitumor Role of the Interleukins 1 to 41," *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, 78(3), 149-162, 2019.
37. Fernández-Delgado, R, Rosado, I, Mares, F. J, Navas, T & Villarroja, J, "Interleukinas y reguladores de la hematopoyesis," *Bol Pediatr*, 33, 163-175, 1992.
38. Floss, D. M, Schönberg, M, Franke, M, Horstmeier, F. C, Engelowski, E, Schneider, A, Rosenfeldt, E. M & Scheller, J, "IL-6/IL-12 Cytokine Receptor Shuffling of Extra- and Intracellular Domains Reveals Canonical STAT Activation via Synthetic IL-35 and IL-39 Signaling," *Scientific Reports*, 7(1), 1-13, 2017.
39. Fouad, Y. A, & Aanei, C, "Revisiting the Hallmarks of Cancer," *American journal of cancer research*, 7(5), 1016, 2017.
40. Gidáli, J, Fehér, I, Megyeri, A & Kovács, P, "Leukaemogenic Potency of WEHI-3B Cells Grown *in vitro* or in Leukaemic Mice," *Bone Marrow Transplant* 28, 699-704, 2001.
41. Gill, H. S, Doull, F, Rutherford, K. J & Cross, M. L, "Immunoregulatory Peptides in Bovine Milk," *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 111-117, 2000.
42. Gómez-Almaguer, D, Marcos-Ramírez, E. R, Montañó-Figueroa, E. H, Ruiz-Argüelles, G. J, Best-Aguilera, C. R, López-Sánchez, M. C, Barrera-Chairez,

- E, López-Arrollo, J. L, Ramos-Peñafiel, C. O, León-Peña, A, González-López, E. E, Rivas-García, P. E, Tellez-Hinojosa, C. A, Gómez-De León, A & Jaime-Pérez, J. C, "Acute Leukemia Characteristics are Different Around the World: The Mexican Perspective," *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 17(1), 46-51, 2017.
43. Hall, C, "Drying of Milk and Products," Second edition. Conneticut, USA: The Avi Pub Company Inc., 1971.
44. Hamerschlak, N, "Leukemia: Genetics and Prognostic Factors," *The Journal of Pediatrics*, 84(4), 52-7, 2008.
45. Hanahan, D, & Weinberg, R. A, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *cell*, 144(5), 646-674, 2011.
46. Hanahan, D, & Weinberg, R. A, "The Hallmarks of Cancer," *cell*, 100(1), 57-70, 2000.
47. Harabuchi, Y, Takahara, M, Kishibe, K, Nagato, T & Kumai, T, "Extranodal Natural Killer/T-Cell Lymphoma, Nasal Type: Basic Science and Clinical Progress," *Frontiers in pediatrics*, 7, 141, 2019.
48. Harvard Health Publishing, "Leukemia," Harvard Health Publishing, 2014, recuperado de: <https://www.health.harvard.edu/cancer/leukemia>
49. Hatton, C. S, Hughes-Jones, N. C & Hay, D, "Hematología: Diagnóstico y Tratamiento," Editorial El Manual Moderno, 2013.
50. Henriksen P. A, "Anthracycline Cardiotoxicity: An Update on Mechanisms, Monitoring and Prevention," *Heart*, 104, 971-977, 2018.

51. HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee, “IL34 Interleukin 34 (*Homo sapiens* (human)), 2020, recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/146433>
52. HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee, “TXLNA taxilin Alpha (*Homo sapiens* (human)),” 2020, recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=200081>
53. Hwang, D, Kim, M, Park, H, Jeong, M. I, Jung, W & Kim, B, “Natural Products and Acute Myeloid Leukemia: A Review Highlighting Mechanisms of Action,” *Nutrients*, 11(5), 1010, 2019.
54. Illangeswaran, R. S. S, Das, S, Paul, D. Z, Mathews, V & Balasubramanian, P, “A Personalized Approach to Acute Myeloid Leukemia Therapy: Current Options,” *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 12, 167, 2019.
55. Jagannathan-Bogdan, M & Zon, L. I, “Hematopoiesis,” *Development*, 140(12), 2463-2467, 2013.
56. Johnsen, L. B, Rasmussen, L. K, Petersen, T. E & Berglund, L, “Characterization of Three Types of Human  $\alpha$  s1- Casein mRNA Transcripts,” *Biochemical Journal*, 309(1), 237-242, 1995.
57. Justiz-Vaillant, A. A, & Qurie, A, “Interleukin,” (Subido el 12 de junio de 2019). En: StatPearls (Internet). Treasure Island (FL): StatPeals Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499840/>
58. Juul, S. E & Christensen, R. D, “Developmental Hematology,” In Avery’s *Diseases of the Newborn*, pp. 1113-1120, 2018.

59. Kasper, D. L, Fauci, A. S, Hauser, S. L, Longo, D. L, Larry Jameson, J & Loscalzo, J, "Chapter 88. Stem Cell Biology," by Minoru S. H. Ko. Harrison's principles of internal medicine (19<sup>th</sup> edition). McGraw Hill Education. 2015.
60. Kipps, T. J, Stevenson, F. K, Wu, C. J, Croce, C. M, Packham, G, Wierda, W. G, O'Brien, S & Rai, K, "Chronic Lymphocytic Leukaemia," *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-22, 2017.
61. Kohnken, R, Porcu, P & Mishra, A, "Overview of the Use of Murine Models in Leukemia and Lymphoma Research," *Frontiers in oncology*, 7, 1-22, 2017.
62. Kolitz, J. E, Strickland, S. A, Cortes, J. E, Hogge, D, Lancet, J. E, Goldberg, S. L, Villa, K. F, Ryan, R. J, Chiarella, M, Louie, A. C, Ritchie E. K & Stuart, R. K, "Consolidation Outcomes in CPX-351 Versus Cytarabine/Daunorubicin-Treated Older Patients With High-Risk/Secondary Acute Myeloid Leukemia," *Leukemia and Lymphoma*, 61(3), 631-640, 2020
63. Kollet, O, Dar, A, Shivtiel, S, Kalinkovich, A, Lapid, K, Sztainberg, Y, Tesio, M, Samstein, R. M, Goichberg, P, Spiegel, A, Elson, A & Lapidot, T, "Osteoclasts Degrade Endosteal Components and Promote Mobilization of Hematopoietic Progenitor Cells," *Nature Medicine*, 12(6), 657-664, 2006.
64. Kon, S, "Milk and Milk Products in Human Nutrition," Second edition. *FAO Nutritional Studies*, Rome, 1977.
65. Kumar, R, Godavarthy, P. S & Krause, D. S, "The Bone Marrow Microenvironment in Health and Disease at a Glance," *Journal of Cell Science*, 131(4), 2018.
66. Ladines-Castro, W, Barragán-Ibañez, G, Luna-Pérez, M. A, Santoyo-Sánchez, A, Collazo-Jaloma, J, Mendoza-García, E & Ramos-Peñafiel, C. O,

“Morphology of Leukaemias,” *Revista Médica del Hospital General de México*, 79(2), 107-113, 2016.

67. Lagunas-Rangel, F. A, “Leucemia Mieloide Aguda. Una perspectiva de los Mecanismos Moleculares del Cáncer,” *Gaceta Mexicana de Oncología*, 15(3), 150-157, 2016.

68. Lancet, J. E, Uy, G. L, Cortes, J. E, Newell, L. F, Lin, T. L, Ritchie, E. K, Stuart, R. K, Strickland, S. A, Hogge, D, Solomon, S. R, Stone, R. M, Bixby, D. L, Kolitz, J. E, Schiller, G. J, Wieduwilt, M. J, Ryan, D. H, Hoering, A, Banerjee, K, Chiarella, M, Louie, A. C & Medeiros, B. C, “CPX-351 (Cytarabine and Daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients with Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia,” *Journal of Clinical Oncology*, 36(26), 2684, 2018.

69. Larsson, J, & Karlsson, S, “The Role of SMAD Signaling in Hematopoiesis,” *Oncogene*, 24(37), 5676-5692, 2005.

70. Ledesma Martínez, E, 1977- sustentante, “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,” UNAM, D.F., 2013.

71. Ledesma-Martínez, E, Cordova-Galaviz, Y, Weiss-Steider, B, Garcia, A & Santiago-Osorio, E, “El Caseinato de Sodio (CasNa) Induce la Producción de TNF-A TGF-B y MIP-1<sup>a</sup> en la Línea Celular 32D,” XLVI Jornada Anual Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología. A. C. Querétato, Querétato, México, 2005.

72. Ledesma-Martínez, E, Domínguez-Meléndez, V, Aguiñiga-Sánchez, I & Santiago-Osorio, E, “Caseins as Regulators of Hematopoiesis,” In *Milk*

*Proteins-Biological Functions in Mammary Gland and the Neonate.*  
IntechOpen, 2020.

73. Ledesma-Martínez, E, Pérez-Cordero, C, Córdova-Galaviz, Y, Sánchez-Tellez, G, Huerta-Yepez, S, Aguiñiga-Sánchez, I, Miranda-Peralta, E, Monroy-García, A, Weiss-Steider, B & Santiago-Osorio, E, "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, 2012.
74. Lee, K, Lee, S. H & Kim, T. H, "The Biology of Prostaglandins and Their Role as a Target for Allergic Airway Disease Therapy," *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1851, 2020.
75. Leukaemia Foundation, "Acute Myeloid Leukemia (AML)," Australia, 2020, Recuperado de <https://www.leukaemia.org.au/disease-information/leukaemias/acute-myeloid-leukaemia/>
76. Liao, N. C, Shih, Y. L, Ho, M. T, Lu, T. J, Lee, C. H, Peng, S. F, Leu, S. J & Chung, J. G, "Cardamonin Induces Immune Responses and Enhances Survival Rate in WEHI-3 Cell-Generated Mouse Leukemia *in vivo*," *Environmental Toxicology*, 35(4), 457-467, 2020.
77. Lin, J. P, Yang, J. S, Lu, C. C, Chiang, J. H, Wu, C. L, Lin, J. J, Lin, H. L, Yang, M. D, Liu, K. C, Chiu, T. H & Chung, J. G, "Rutin Inhibits the Proliferation of Murine Leukemia WEHI-3 Cells *in vivo* and Promotes Immune Response *in vivo*," *Leukemia research*, 33(6), 823-828, 2009.
78. Lotem, J & Sachs, L, "Control of *in vivo* Differentiation of Myeloid Leukemic Cells. III. Regulation by T lymphocytes and Inflammation," *International Journal of Cancer* 32, 781-791, 1983.

79. Lotem, J & Sachs, L, "Independent Regulation of Myeloid Cell Growth and Differentiation Inducing Proteins: *in vivo* Regulation by Compounds that Induce Inflammation," *International Journal of Cancer*, 35, 93-100, 1985.
80. Lu, C. C, Yang, J. S, Chiang, J. H, Hour, M. J, Lin, K. L, Lin, J. J, Huang, W. W, Tsuzuki, M, Lee, T. H & Chung, J. G, "Novel Quinazolinone MJ-29 Triggers Endoplasmic Reticulum Stress and Intrinsic Apoptosis in Murine Leukemia WEHI-3 Cells and Inhibits Leukemic Mice," *PloS one*, 7(5), 2012.
81. Luo, X. H, Zhu, Y & Tang, X. Q, "Acute Basophilic Leukemia Presenting with Maculopapular Rashes and a Gastric Ulcer: A Case Report," *Oncology letters*, 8(6), 2513–2516, 2014.
82. MacLean, A. L, Lo Celso, C & Stumpf, M. P, "Concise Review: Stem Cell Population Biology: Insights from Hematopoiesis," *Stem Cells*, 35(1), 80-88, 2017.
83. Mayani, H, Flores-Figueroa, E, Pelayo, R, Montesinos, J. J, Flores-Guzmán, P & Chávez-González, A, "Hematopoyesis," *Cancerología*, 2(2), 95-107, 2007.
84. Meléndez Ibarra, F. M, sustentante, "Efecto Sinérgico del Caseinato de Sodio Combinado con Citarabina o Daunorrubicina en la Eliminación de Células Leucémicas WEHI-3," UNAM, CDMX, 2019.
85. Metcalf, D, Robb, L, Dunn, A, Mifsud, S & Rago, L, "Role of Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor and Granulocyte Colony-Stimulating Factor in the Development of an Acute Neutrophil Inflammatory Response in Mice," *Blood*, 88, 3755-3764, 1996.

86. Mohan, S, Abdul, A. B, Abdelwahab, S. I, Al-Zubairi, A. S, Sukari, M. A, Abdullah, R, Elhassan Taha, M. M, Beng, N. K & Isa, N. M, “*Typhonium flagelliforme* Inhibits the Proliferation of Murine Leukemia WEHI-3 Cells *in vitro* and Induces Apoptosis *in vivo*,” *Leukemia research*, 34(11), 1483-1492, 2010.
87. Nombela-Arrieta, C & Silberstein, L. E, “The Science Behind the Hypoxic Niche of Hematopoietic Stem and Progenitors,” *Hematology: the American Society of Hematology Education Program*, 2014(1), 542–547, 2014.
88. Olson, O. C, Kang, Y. A & Passegué, E, “Normal Hematopoiesis Is a Balancing Act of Self-Renewal and Regeneration,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(12), 2020.
89. Oran, B & Weisdorf, D. J, “Survival for Older Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Population-Based Study,” *Haematologica*, 97(12), 1916-1924, 2012.
90. Orkin, S. H & Zon, L. I, “Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology,” *Cell*, 132(4), 631-644, 2008.
91. Owen, J. A, Punt, J, Stranford, S. A, Jones, P. P, Rivera-Muñoz, B & Owen, J. A, *Kuby inmunología (Cuarta edición)*. McGraw-Hill Interamericana, 2014.
92. Pantoja, M. D, Romero-Ramírez, H & Alba, J. C. R, “Células Madre Hematopoyéticas: Origen, Diferenciación y Función,” *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 15(1), 29-37, 2015.
93. Passaro, D, Di Tullio, A, Abarategi, A, Rouault-Pierre, K, Foster, K, Ariza-McNaughton, L, Montaner, B, Chakravarty, P, Bhaw, L, Diana, G, Lassailly, F, Gribben, J & Bonnet, D, “Increased Vascular Permeability in the Bone

Marrow Microenvironment Contributes to Disease Progression and Drug Response in Acute Myeloid Leukemia,” *Cancer cell*, 32(3), 324-341, 2017.

94. Pietras E. M, “Inflammation: A Key Regulator of Hematopoietic Stem Cell Fate in Health and Disease,” *Blood*, 130(15), 1693–1698, 2017.

95. Pinho, S, & Frenette, P. S, “Haematopoietic Stem Cell Activity and Interactions with the Niche,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(5), 303-320, 2019.

96. Polychronakis, I, Dounias, G, Makropoulos, V, Riza, E & Linos, A, “Work-Related Leukemia: A Systematic Review,” *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 8(1), 1-14, 2013.

97. Ramos, G, Weiss, B, Córdova, Y, Hernández, J, Zambrano, I, & Santiago, E, “Sodium Caseinate Induces Expression and Secretion of Murine Multipotent Myeloid Cell Line 32D Macrophage Colony-Stimulating Factor,” *Archives of medical research*, 35(2), 109-113, 2004.

98. Ramos-Mandujano, G, Weiss-Steider, B, Melo, B, Córdova-Galaviz, Y, Ledesma-Martínez, E, Bustos, S, Silvestre, O, Aguiñiga-Sánchez, I, Sosa, N, Martínez, I, Sánchez, L, García, A, Santiago-Osorio, E, “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, 2008.

99. Ratajczak, M. Z, Zuba-Surma, E. K, Wysoczynski, M, Wan, W, Ratajczak, J, Wojakowski, W & Kucia, M, “Hunt for Pluripotent Stem Cell–Regenerative Medicine Search for Almighty Cell,” *Journal of autoimmunity*, 30(3), 151-162, 2008.

100. Renneville, A, Roumier, C, Biggio, V, Nibourel, O, Boissel, N, Fenaux, P & Preudhomme, C, "Cooperating Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia: A Review of the Literature," *Leukemia*, 22(5), 915-931, 2008.
101. Ruiz-Argüelles, G. J, "Advances in the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Leukemia in Mexico," *Salud pública de México*, 58, 291-295, 2016.
102. Salmen, S, Silva-Gutierrez, N, Bahsas-Zaky, R, Terán-Angel, G, Barboza, L, Padrón, K, Berrueta, L, Olávez, D, Solórzano, E, Calderón, A, Valencia-Molina, J. C, Soto-Parra, M, Volcanes, I, Paredes, E, A & Rondon, M, "Células Progenitoras Pluripotenciales: Características y Compartimientos Especializados de Residencia," *Avances en biomedicina*, 2(1), 26-38, 2013.
103. Santiago-Osorio, E, Ledesma-Martínez, E, Aguiñiga-Sánchez, I, Poblano-Pérez, I, Weiss-Steider, B, Montesinos-Montesinos, J. J & Mora-García, M. L, "Sodium Caseinate (CasNa) Induces Mobilization of Hematopoietic Stem Cells in a BALB/c Mouse Model," *Medical science monitor basic research*, 21, 206, 2015.
104. Santiago-Osorio, E, Ledesma-Martínez, E, Weiss-Steider, B, Muñoz-Galindo, L, Domínguez-Meléndez, V, Aguiñiga-Sánchez, I, Córdova-Galaviz, Y, Moreno-Fierros, L & Tiburcio-Félix, R, "Avances en la Regulación de la Proliferación y Diferenciación de Células Hematopoyéticas, tanto Normales como Leucémicas, por la Caseína y sus Componentes," *Revista de Hematología*, 11(4), 193-198, 2010.
105. Santiago-Osorio, E, Mora, L, Bautista, M, Montesinos, J. J, Martínez, I, Ramos-Mandujano, G, Zambrano, R, Monroy-García, A, Weiss-Steider, B, Ledesma-Martínez, E & Aguiñiga-Sánchez, I, "Sodium Caseinate Induces

Secretion of Macrophage Colony-Stimulating Factor from Neutrophils," *Immunobiology*, 215(4), 332-339, 2010.

106. Saultz, J. N & Garzon, R, "Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review," *Journal of clinical medicine*, 5(3), 33, 2016.
107. Schuettpelz, L & Link, D, "Regulation of Hematopoietic Stem Cell Activity by Inflammation," *Frontiers in immunology*, 4, 204, 2013.
108. Schwarzer, A. P, Butler, J, Jackson, K, Beligaswatte, A, Martin, L, Kennedy, G, Daniela, Z, Lewis, I, Hiwase, D, Wight, J, He, S, Grigg, A, Morris, K, Mollee, P & Marlton, P, "A Comparison of High-Dose Cytarabine During Induction Versus Consolidation Therapy in Newly Diagnosed AML," *HemaSphere – the European Hematology Association*, 2(6), 158, 2018.
109. Sekeres, M. A, Guyatt, G, Abel, G, Alibhai, S, Altman, J. K, Buckstein, R, Choe, H, Desai, P, Erba, H, Hourigan, C. S, LeBlanc, T. W, Litzow, M, MacEachern, J, Michaelis, L. C, Mukherjee, S, O'Dwyer, K, Rosko, A, Stone, R, Agarwal, A, Colunga-Lozano, L. E, Chang, Y, Hao, Q. K & Brignardello-Petersen, R, "American Society of Hematology 2020 Guidelines for Treating Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia in Older Adults," *Blood Advances*, 4(15), 3528–3549, 2020.
110. Short, N. J, Rytting, M. E & Cortes, J. E, "Acute Myeloid Leukaemia," *The Lancet*, 392(10147), 593-606, 2018.
111. Sieff, C. A, "Overview of Hematopoietic Stem Cells," *UpToDate. Negrin RS (Ed)*, Waltham, MA, 2019.

112. Skayneh, H, Jishi, B, Hleihel, R, Hamieh, M, Darwiche, N, Bazarbachi, A, El Sabban, M & El Hajj, H, "A Critical Review of Animal Models Used in Acute Myeloid Leukemia Pathophysiology," *Genes*, 10(8), 614, 2019.
113. Stalfelt, A. M, Brodin, H, Pettersson, S & Eklöf, A, "The Final Phase in Acute Myeloid Leukaemia (AML)," *Leukemia Research*, 27(6), 481–488, 2003.
114. Su, C. C, Yang, J. S, Lin, S. Y, Lu, H. F, Lin, S. S, Chang, Y. H, Huang, W. W, Li, Y. C, Chang, S. J & Chung, J. G, "Curcumin Inhibits WEHI-3 Leukemia Cells in BALB/c Mice *in vivo*," *in vivo*, 22(1), 63-68, 2008.
115. Walstra, P & Jenner, R, "Dairy Chemistry and Physics," First edition. New York, USA: Wiley and Sons, 1984.
116. Warner, J, "Principios de la Tecnología de Lácteos," 1ª edición. México: AGT, 1976.
117. Warner, N. L, Moore, M. A & Metcalf, D, "A Transplantable Myelomonocytic Leukemia in BALB/c Mice: Cytology, Karyotype, and Muramidase Content," *Journal of the National Cancer Institute*, 43(4), 963-982, 1969.
118. Weiss-Steider, B, Córdova-Galaviz, Y, Aguiñiga-Sánchez, I, Ledesma-Martínez, E, Domínguez-Melendez, V & Santiago-Osorio, E, "El Caseinato de Sodio y la Caseína  $\alpha$  Inhiben la Proliferación de la Línea Celular Mieloide de Ratón 32D clone 3 (32Dcl3) Mediante el TNF- $\alpha$ ," *Biomédica*, 39(2), 291-299, 2019.
119. WHO Expert Committee on the Selection, Use of Essential Medicines, & World Health Organization, "The Selection and Use of Essential Medicines:

Report of the WHO Expert Committee, 2013 (including the 18th WHO Model List of Essential Medicines and the 4th WHO Model List of Essential Medicines for Children) (Vol. 985),” World Health Organization, 2014.

120. Wong, K. Y & Lampkin, B. C, “Anthracycline Toxicity,” *The American journal of pediatric hematology/oncology*, 5(1), 93-97, 1983.
121. Yi, B, Zhang, Z, Zhang, M, Schwartz-Albiez, R & Cao, Y, “CD176 Antiserum Treatment Leads to a Therapeutic Response in a Murine Model of Leukemia,” *Oncology Reports*, 30, 1841-1847, 2013.
122. Yin, T & Li, L, “The Stem Cell Niches in Bone,” *The Journal of clinical investigation*, 116(5), 1195–1201, 2006.
123. Zhang, C. C & Sadek, H. A, “Hypoxia and Metabolic Properties of Hematopoietic Stem Cells,” *Antioxidants and redox signaling*, 20(12), 1891–1901, 2014.
124. Zhang, P, Zhang, C, Li, J, Han, J, Liu, X & Yang, H, “The Physical Microenvironment of Hematopoietic Stem Cells and its Emerging Roles in Engineering Applications,” *Stem cell research and therapy*, 10(1), 1-13, 2019.