



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTO DEL CASEINATO DE SODIO (CasNa) SOBRE LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ENRIQUE OSWALDO SILVESTRE SANTANA

DIRECTOR DE TESIS: EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

COMITÉ TUTORAL: Dr. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2011



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.



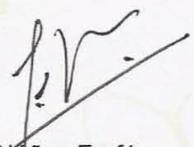
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de noviembre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **SILVESTRE SANTANA ENRIQUE OSWALDO** con número de cuenta **97353465** con la tesis titulada "**EFECTO DEL CASEINATO DE SODIO (CasNa) SOBRE LA MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**:

Presidente: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
Vocal: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Secretario: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de enero de 2011.



Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

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

AGRADECIMIENTOS

- .- Al Posgrado en Ciencias Biológicas por el apoyo recibido durante el curso del posgrado.

- .- A CONACYT por haber apoyado la realización del presente trabajo con el programa de becas para estudios de posgrado.

- .- Al proyecto PAPIIT IN225610 y IN217407, de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), que de igual manera apoyó el presente trabajo.

- .- Al comité tutorial integrado por el Dr. Edelmiro Santiago Osorio, Dr. Juan José Montesinos Montesinos y Dra. María de Lourdes Mora García así como a los miembros del jurado Dr. Alberto Monroy García y Dra. Leticia Moreno Fierros, por la asesoría y comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

- .- Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por la asesoría y por haber permitido mi estancia en el laboratorio de hematopoyesis y leucemia, durante el curso de la presente tesis.

- .- Finalmente un agradecimiento especial a la Dra. Leticia Moreno Fierros por todo el apoyo y las atenciones recibidas para realizar la parte experimental con citometría de flujo así como el análisis de resultados.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	1
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción.....	6
Hematopoyesis.....	6
Células troncales hematopoyéticas.....	6
Células progenitoras hematopoyéticas.....	9
Microambiente hematopoyético y citocinas.....	11
Nichos de células troncales hematopoyéticas.....	16
Hematopoyesis extramedular.....	17
Movilización de células troncales y progenitoras hematopoyéticas.....	18
Caseínas y hematopoyesis.....	20
Planteamiento del problema.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	24
Material y método.....	25
Resultados.....	28
Discusión de resultados.....	45
Conclusiones.....	52
Perspectivas.....	53
Bibliografía.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ATRA	Ácido all-trans retinoico
APC	Aloficocianina
CasNa	Caseinato de sodio
C-kit	Receptor de SCF
CLP	Progenitor linfoide común
CMP	Progenitor mieloide común
CSF	Factor estimulador de colonias
CXCR4	Receptor del factor derivado de células estromales-1
Eporh	Eritropoyetina recombinante humana
Flk2	Receptor del ligando Flt3
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GMP	Progenitor de granulocitos-macrófagos
HE	Hematopoyesis extramedular
HPC	Célula progenitora hematopoyética
HSC	Célula troncal hematopoyética
HSPC	Célula troncal/progenitora hematopoyética

IL	Interleucina
IL-3rm	Interleucina-3 recombinante de ratón
IL-6rh	Interleucina-6 recombinante humana
JAK	Janus tirosinas cinasas
KLS	C-kit, lin, Sca-1
Lin	Linaje
LT-HSC	Célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo
ME	Matriz extracelular
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MEP	Progenitor eritroide-megacariocítico
MN	Mononucleadas
MPP	Progenitor multipotente
MSC	Célula troncal mesenquimal
PE	Ficoeritrina
PerCP-Cy5.5	Complejo proteína clorofila peridina-Cy5.5
Sca-1	Antígeno de células troncales-1
SCF	Factor estimulador de células troncales
SCFrm	Factor estimulador de células troncales recombinante de ratón
SDF-1	Factor derivado de células estromales-1

STAT	Transductores de señales y activadores de la transcripción
ST-HSC	Célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo
UFC	Unidad formadora de colonias
UFC-Ba	Unidad formadora de colonias de basófilos
UFC-Dc	Unidad formadora de colonias de células dendríticas
UFC-E	Unidad formadora de colonias de eritrocitos
UFC-Eo	Unidad formadora de colonias de eosinófilos
UFC-G	Unidad formadora de colonias de granulocitos
UFC-GM	Unidad formadora de colonias de granulocitos-macrófagos
UFC-M	Unidad formadora de colonias de macrófagos
UFC-Mk	Unidad formadora de colonias de megacariocitos
UFC-preB	Unidad formadora de colonias de células pre-B
Veh	Vehículo

RESUMEN

Bajo condiciones normales las células progenitoras hematopoyéticas (**HPCs**) se encuentran en un número bajo en circulación, sin embargo pueden ser movilizadas a sangre periférica, incrementando su número, por citocinas como el factor estimulador de colonias de granulocitos (**G-CSF**) o de granulocitos-macrófagos (**GM-CSF**). Se ha mostrado que la hematopoyesis puede ser regulada por moléculas diferentes a la familia de las citocinas como el ácido all-transretinoico y las caseínas. El caseinato de sodio (**CasNa**), una sal derivada de la caseína, favorece la migración de granulocitos a cavidad peritoneal así como un aumento en los niveles de G-CSF y GM-CSF; además aumenta la celularidad en bazo, un evento que puede involucrar migración de HPCs, sin embargo se desconoce si el CasNa induce una movilización de HPCs a sangre periférica. El presente trabajo muestra el efecto del CasNa, en ratón, sobre la movilización de HPCs a torrente sanguíneo. Los resultados mostraron que el CasNa aumentó el número de células mononucleadas en médula ósea y bazo. Se mostró también que el CasNa aumentó el número de HPCs, 2 veces en bazo y 5 veces en sangre periférica, revelado por la formación de unidades formadoras de colonias (**UFCs**) en un cultivo de metilcelulosa, lo cual sugiere activación de la hematopoyesis extramedular y movilización. Las UFCs encontradas en bazo y sangre pertenecen al linaje de granulocitos, macrófagos y eritrocitos. Finalmente al determinar el inmunofenotipo, mediante citometría de flujo, se encontró que el CasNa, en médula ósea, incrementó el porcentaje de la población lin- (**negativo**), c-kit alto y Sca-1 alto, mostrando además en bazo y sangre un aumento en el porcentaje de la población lin-, c-kit alto y Sca-1 bajo, un inmunofenotipo similar al de HPCs mieloides. Este conjunto de datos sugieren que el CasNa moviliza HPCs a torrente sanguíneo y activa la hematopoyesis extramedular.

ABSTRACT

Under normal conditions the hematopoietic progenitor cells (**HPCs**) circulate in the peripheral blood in very low numbers however they can be mobilized to peripheral blood, increasing its number, by cytokines such as the granulocyte-colony stimulating factor (**G-CSF**) or the granulocyte-macrophage- colony stimulating factor (**GM-CSF**). It has been shown that hematopoiesis may be regulated by different molecules to the family of cytokines such as all-trans retinoic acid and casein. The sodium caseinate (**CasNa**), a salt derived from casein, promotes the migration of granulocytes to the peritoneal cavity as well as an increase in the concentrations of G-CSF and GM-CSF; also increases the cellularity in spleen, an event that may involve migration of HPCs, however it is unknown whether the CasNa could mobilize HPCs to the circulation. In this work we showed the effect of CasNa, in mice, on the mobilization of HPCs to peripheral blood. The data shown that CasNa increases the number of mononuclear cells in bone marrow and spleen. It also was showed that the CasNa increases the number of HPCs, two fold in the spleen and five folds in the peripheral blood, as was showed by the formation of colony forming units (**UFCs**), suggesting an induction of extramedullary hematopoiesis and mobilization. The UFCs founded in spleen and peripheral blood belongs to the lineage of granulocytes, macrophages and erythrocytes. Finally to determine the immunophenotype, by flow cytometry, was found that CasNa increases the percentage of lin- (**negative**), c-kit high, Sca-1 high cell population in the bone marrow, moreover in the spleen and blood was there is an increase in the percentage of the lin-, c-kit high and Sca-1 low cell population, a similar immunophenotype reported for myeloid HPCs. This data pointing that CasNa mobilize HPCs to peripheral blood and promotes the extramedullary hematopoiesis.

INTRODUCCIÓN

Hematopoyesis

Células troncales hematopoyéticas

Las células sanguíneas maduras presentes en circulación, realizan distintas funciones para el organismo. Los eritrocitos transportan oxígeno, las plaquetas intervienen en el proceso de coagulación sanguínea mientras que los granulocitos, monocitos y linfocitos participan en la defensa inmune contra los agentes patógenos, sin embargo tienen una vida media finita, por lo que existe la necesidad de una constante renovación de células **(Bellantuono, 2004)**. Al proceso de generación de células sanguíneas, a partir de una célula troncal hematopoyética **(HSC, por sus siglas en inglés, hematopoietic stem cell)**, se le conoce como **hematopoyesis (Mayani et al., 2007)**.

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

Debido a su potencial de reconstitución las HSCs pueden ser divididas en: células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo **(LT-HSCs)**, capaces de autorenovarse indefinidamente durante toda la vida; y células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a corto plazo **(ST-HSCs)** que sólo pueden autorenovarse durante un intervalo definido de tiempo, alrededor de 4-8 semanas

(Weisman, 2000a, 2000b). Las LT-HSCs son mantenidas en estado quiescente o ciclan lentamente mientras que las ST-HSCs están activamente ciclando.

Las HSCs y las células progenitoras hematopoyéticas pueden ser identificadas usando marcadores específicos (**tabla 1**). La mayoría de las estrategias, para purificar e identificar HSCs en ratón, giran en torno a la expresión positiva de c-kit y Sca-1 y la expresión negativa de Lin (un cóctel de marcadores para células hematopoyéticas maduras típicamente B220, CD4, CD8, Gr-1, Mac-1 y Ter119). Aunque esta población c-kit⁺ Lin⁻ Sca-1⁺ (**KLS**) se encuentra bastante enriquecida en células primitivas con actividad reconstituyente hematopoyética, también contiene células progenitoras hematopoyéticas. Aproximadamente solo el 10% de las células KLS son HSC-LT capaces de reconstituir el compartimento de un ratón letalmente irradiado (**Challen et al., 2009**).

C-kit es un receptor tirosina cinasa tipo III, su papel está asociado al mantenimiento y sobrevivencia de HSCs y células mast, es expresado en HSCs, células progenitoras mieloides, células dendríticas, células mast, células pro-B y pro-T pero se pierde en la diferenciación de las células B y T por lo que c-kit es utilizado en conjunto con otros marcadores como Sca-1 y Lin para la identificación de células troncales/progenitoras hematopoyéticas (**HSPCs**) (**Ray et al., 2008**).

Sca-1 es una proteína de superficie celular anclada al fosfatidil-inositol glicosil, pertenece a la familia del gen Ly6, su función es desconocida, es expresado principalmente en HSCs de ratón, linfocitos T maduros y otros tipos celulares de origen hematopoyético distinto. Sca-1 es usado rutinariamente en combinación con otros marcadores para el enriquecimiento de HSCs de ratón (**Holmes & Stanford, 2007**).

Inmunofenotipo	Tipo de célula
KLS	HSC y HPC
SP^{KLS}	HSC-LT
Flk-2- CD34- KLS	HSC-LT
CD150+ CD48- CD41- KLS	HSC-LT
CD45^{mid} Lin- Rodamina^{low} SP	HSC-LT
Flk2+ CD34+ KLS	HSCs-ST y progenitor multipotente
Lin- IL-7α+ c-kit+ Sca-1+	CLP
Lin- IL-7α- c-kit+ Sca-1-	Progenitores mieloides
Lin- IL-7α- c-kit+ Sca-1- CD34+ CD16/32-	CMP
Lin- IL-7α- c-kit+ Sca-1- CD34- CD16/32-	MEP
Lin- IL-7α- c-kit+ Sca-1- CD34+ CD16/32+	GMP

Tabla 1. Marcadores de superficie celular de varias poblaciones de células troncales y progenitoras hematopoyéticas en ratón. KLS (c-kit, Lin y Sca-1), marcadores de células troncales/progenitoras hematopoyéticas; c-kit, receptor del SCF; Sca-1, antígeno de células troncales de ratón; Lin, cóctel de marcadores de células maduras sanguíneas; SP, población de lado; Flk-2, receptor del ligando Flt-3; CD34, marcador de células troncales; CD150, CD48, CD41, marcadores de la familia de activación de la señalización de linfocitos (SLAM); CD45, marcador común de células sanguíneas excepto eritrocitos y plaquetas; rodamina, colorante que las HSCs pueden efluir; IL-7 α , receptor de la IL-7; CD16/32, receptor de Fc γ II y Fc γ III respectivamente; HSC, célula troncal hematopoyética; HPC, célula progenitora hematopoyética; HSC-LT, célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo; HSC-ST, célula reconstituyente a corto plazo; CLP, progenitor linfoide común; CMP, progenitor mieloiide común; MEP, progenitor eritroiide-megacariocítico; GMP, progenitor de granulocito-macrófagos. Tomado de Challen *et al.*, 2009.

Células progenitoras hematopoyéticas

La progenie inmediata de las HSCs son las células progenitoras hematopoyéticas (**HPCs**), una población intermedia entre las células troncales y las células maduras sanguíneas, poseen una capacidad proliferativa limitada y un alto potencial de diferenciación (**Mayani, 2003**). Representan el 0.1% de las células totales en la médula ósea y su función principal es incrementar los números de células maduras (**Bellantuono, 2004**).

Existen distintas HPCs dependiendo del linaje. La primer progenie de las HSC son los progenitores multipotentes (**MPPs**) (**Adolfsson et al., 2001**). De la diferenciación de los MPP descienden los progenitores mieloides comunes (**CMP**) y los progenitores linfoides comunes (**CLP**) (**Hao et al., 2001; Kondo et al., 1997; Manz et al., 2002**). A su vez de los CMP se originan los progenitores de eritrocitos y megacariocitos (**MEP**) y los progenitores de granulocitos-macrófagos (**GMP**). Los CLP darán origen sólo a linfocitos B, T y células llamadas asesinas naturales (**NKs**). Ambos, CMPs y CLPs pueden dar origen a las células dendríticas (**Traver et al., 2000; Manz et al., 2001**). Todas estas poblaciones de HPCs son separables como poblaciones puras empleando marcadores de superficie y se ha demostrado que carecen de actividad autorenovadora después de un trasplante (**Na Nakorn et al., 2002**). Cuando las HPCs son estimuladas apropiadamente forman colonias en medios de cultivo semisólidos, a las que normalmente se les denominan unidades formadoras de colonias (**UFCs**), estas pueden ser de: granulocitos (**UFC-G**), basófilos (**UFC-Ba**), eosinófilos (**UFC-Eo**), macrófagos (**UFC-M**), granulocito-macrófagos (**UFC-GM**), eritrocitos (**UFC-E**), megacariocitos (**UFC-Mk**), células B (**UFC-preB**), y células dendríticas (**UFC-Dc**) (**Akashi et al., 2000**). Todas las HPCs anteriores son células que darán origen a las células sanguíneas maduras presentes en circulación. De esta manera la jerarquización del origen de las células hematopoyéticas es representada en la **Figura 1**.

Cascada hematopoyética

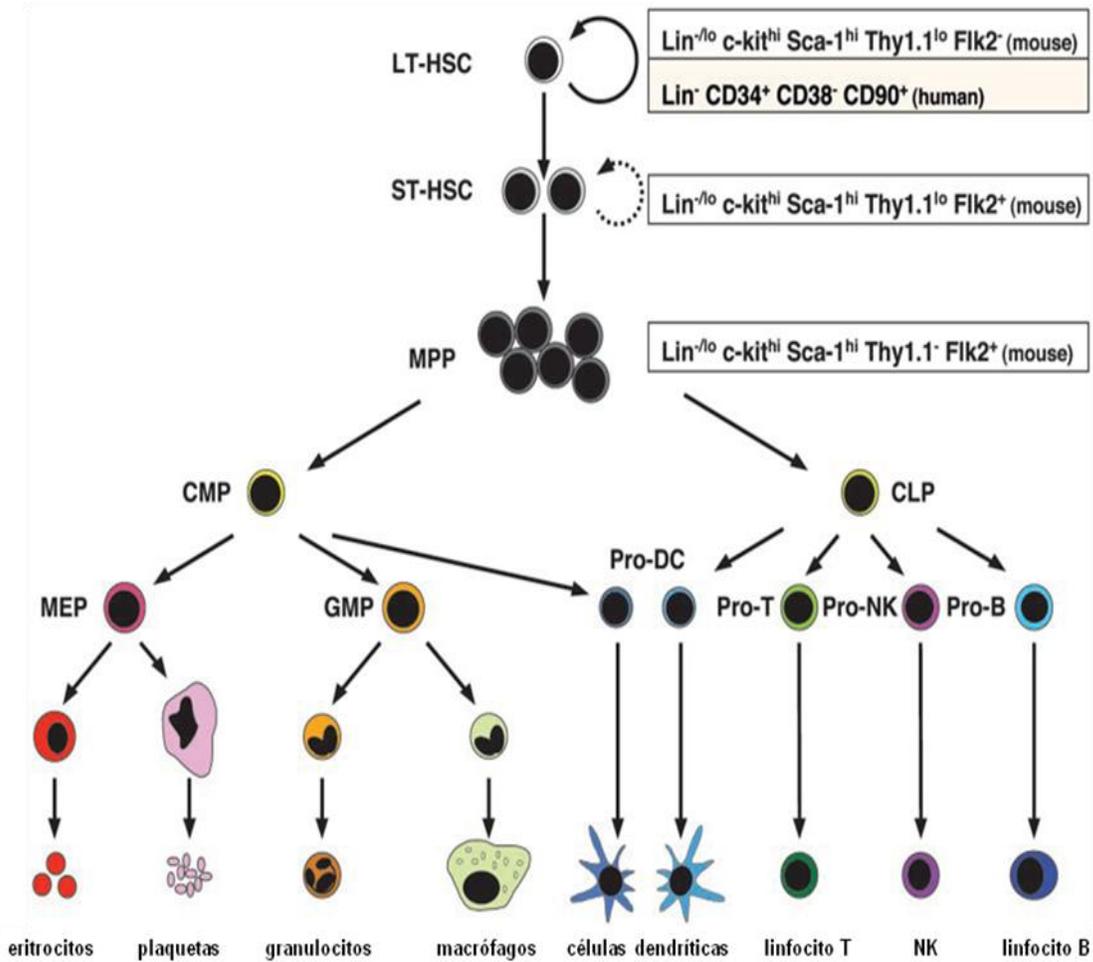


Figura 1. Jerarquía de las células hematopoyéticas. LT-HSCs, células troncales reconstituyentes a largo plazo; ST-HSCs, células troncales reconstituyentes a corto plazo; MPP, progenitores multipotentes; CMP, progenitores mieloides comunes; CLP, progenitores linfoides comunes; MEP, progenitores megacariocitos-eritrocitos; GMP, progenitores granulocitos-macrófagos. Tomado y modificado de Passegue *et al.*, 2003.

Microambiente hematopoyético y citocinas

Las células troncales mesenquimales (**MSCs**) son otro tipo de células que también residen en la médula ósea y se ha propuesto que dan origen a la mayoría de los linajes de células estromales incluyendo condrocitos, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, células endoteliales y miocitos, demostrado *in vitro* y parcialmente *in vivo* (**Wang et al., 2006, Mugurama et al., 2006**). Las células estromales en cooperación con las células hematopoyéticas crean un ambiente particular produciendo citocinas y componentes de la matriz extracelular (**ME**) (**colágeno I-VI, fibronectina, tenascina, laminina, trombospondina, proteoglicanos, moléculas de adhesión como: integrinas, cadherinas, selectinas**). Estos elementos en conjunto proveen un sistema de soporte estructural y funcional denominado microambiente hematopoyético donde las células hematopoyéticas pueden proliferar, diferenciarse, migrar e incluso sufrir apoptosis (**Prosper & Verfaillie, 2001**) (**Figura 2**).

Microambiente hematopoyético

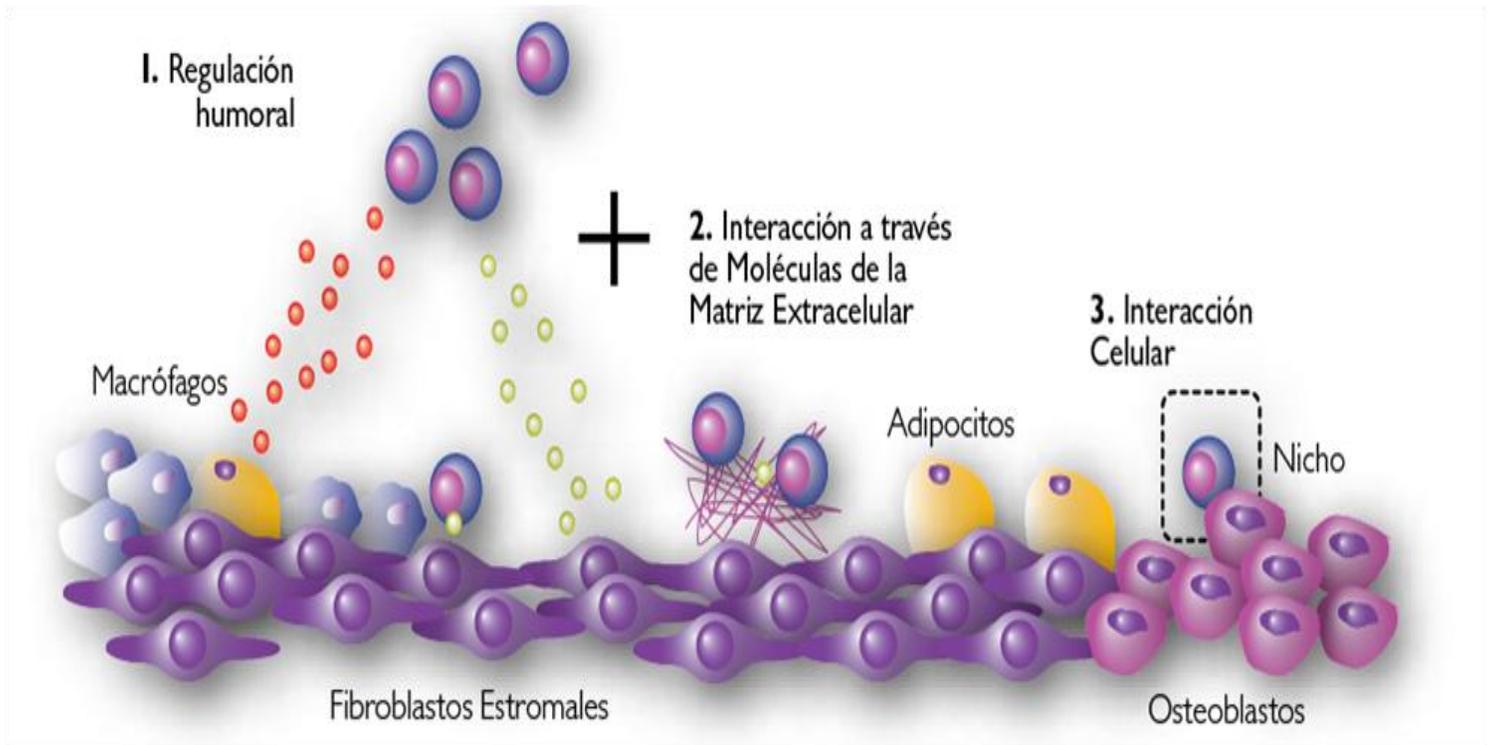


Figura 2. Microambiente hematopoyético. Dentro de la médula ósea se encuentran las células hematopoyéticas y estromales quienes secretan citocinas y moléculas de la ME, las citocinas pueden estar presentes en forma de unión a la célula, unidas a la ME o en solución, todos estos elementos en conjunto proveen un sistema de soporte para apoyar y regular la proliferación, diferenciación, migración y muerte de las células hematopoyéticas así como la autorenovación y quiescencia de las HSCs en nichos específicos. Tomado de Mayani *et al.*, 2007.

Las citocinas, son moléculas de naturaleza proteica que actúan a través de la unión a receptores específicos de membrana activando una gran variedad de rutas de señalización implicadas en la proliferación, maduración, autorenovación o muerte celular. Por su efecto biológico y características moleculares las citocinas se han dividido en: factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias (**CSFs**), interferones, interleucinas (**ILs**) y quimiocinas (**Davis et al., 1996; Aguirre de Avalos, 2002**). Estas moléculas presentan retro-regulaciones positivas y negativas entre sí y por lo general actúan en conjunto con otras citocinas, las cuales pueden ser producidas por la misma célula o células vecinas (**Sachs, 1996**).

Los cultivos *in vitro* del tejido hematopoyético, a largo plazo, han permitido establecer que la hematopoyesis se sostiene debido a que las células del estroma secretan diversas citocinas, entre ellas las ILs: IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-7, IL-10, IL-13, entre otras (**Metcalf, 1998**).

Las citocinas pueden ser expresadas en la membrana de las células o encontrarse solubles en el medio extracelular, y actúan en una manera paracrina, yuxtacrina o autócrina. Los CSFs han sido ampliamente estudiados y se ha mostrado que son esenciales para el desarrollo de los distintos tipos de células sanguíneas. Ellos incluyen al factor estimulador de colonias de macrófagos (**M-CSF**), granulocitos (**G-CSF**), granulocitos y macrófagos (**GM-CSF**) y el factor estimulador de colonias-multi mejor conocido como IL-3. Las citocinas muestran un efecto pleiotrópico ya que exhiben una amplia variedad de funciones biológicas sobre varios tejidos y células ejerciendo funciones similares. En general regulan la sobrevivencia, proliferación, diferenciación, quimiotaxis, degranulación, activación, adhesión, citotoxicidad e incluso cambios de fenotipo en las células hematopoyéticas (**Barreda et al., 2004**).

Para que las citocinas puedan ejercer sus efectos deben unirse a receptores específicos sobre células blancas. La formación del complejo receptor-ligando trae como consecuencia el desencadenamiento de señales intracelulares a través de la activación de tirosinas cinasas, dando como resultado final la activación celular y una determinada respuesta biológica. La familia Janus de tirosinas cinasas (**JAKs**) y los transductores de señales y activadores de la transcripción (**STATs**) son proteínas intracelulares que están secuencialmente activadas durante la señalización en los receptores de citocinas. La integración de estos estímulos intracelulares e extracelulares a través de una compleja red de rutas reguladoras culmina en una respuesta general, la expresión de genes específicos y por consiguiente la expresión de proteínas específicas (**Ihle & Kerr, 1995**).

A nivel estructural básico, muchos receptores de citocinas consisten de un complejo multisubunidad: una subunidad específica de unión al ligando y una subunidad de transducción de señales. En general el dominio extracelular comprende aproximadamente 210 aminoácidos y contiene uno o más residuos de cisteína conservados (C). En adición, una segunda secuencia, conservada de triptófano-serina-X-triptófano-serina (W-S-X-W-S), donde X se refiere a cualquier residuo de aminoácido no conservado, está presente en el extremo C. Aunque los receptores de citocinas hematopoyéticos se encuentran agrupados juntos, debido a la presencia de motivos compartidos dentro de sus dominios extracelulares, ellos pueden ser subdivididos en familias basados sobre el número de subunidades y/o la presencia de una o más subunidades compartidas. Los principales subtipos de receptores de citocinas son 1) aquellos que señalizan a través de gp130 o una subunidad relacionada a gp130, 2) aquellos que señalizan a través de una cadena γ_c común y subunidades a y/o b de unión al ligando, 3) aquellos que señalizan a través de una cadena simple, 4) aquellos que señalizan a través de dos o más subunidades y 5) aquellos que señalizan a través de la subunidad gp140 β y una subunidad α de unión al ligando (**Baker et al., 2007**) (**Figura 3**).

Receptores de citocinas

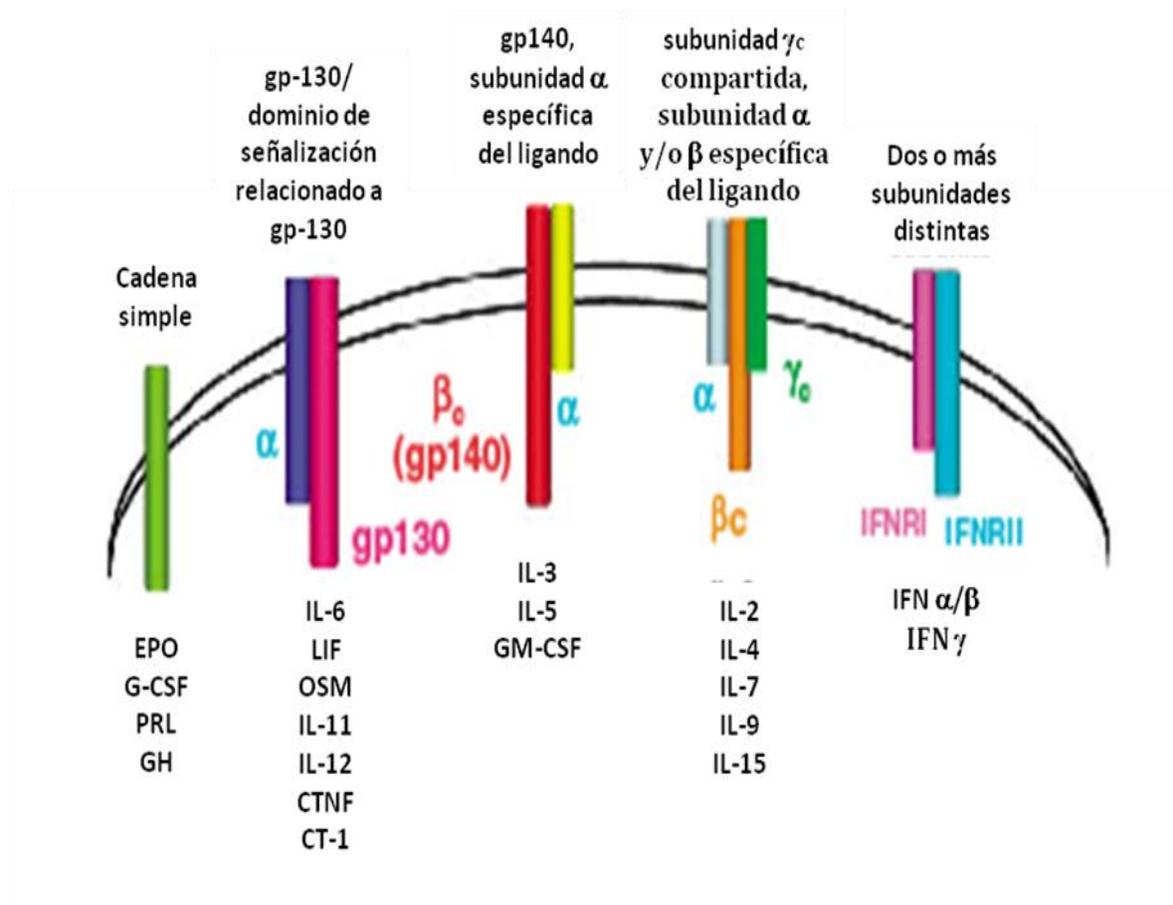


Figura 3. Familias de receptores de citocinas. De acuerdo al número de sub-unidades y/o la presencia de una o más sub-unidades compartidas los receptores se dividen en: receptores de cadena simple; receptores con sub-unidad gp130 o sub-unidad relacionada a gp130; receptores con la sub-unidad gp140 β y una sub-unidad α de unión al ligando; receptores con sub-unidad cadena γ común y sub-unidades α y/o β de unión al ligando; receptores con dos o más sub-unidades diferentes. Tomado y modificado de Baker *et al.*, 2007.

Nichos de células troncales hematopoyéticas

Las HSCs persisten a lo largo de toda la vida y dinámicamente regulan sus números mediante una autorenovación que depende de mecanismos celulares intrínsecos y extrínsecos. Se piensa que las HSCs residen dentro de **nichos**, sitios específicos dentro de la médula ósea con microambientes especializados, creado por células estromales que producen citocinas y que además proveen señales para su sobrevivencia, autorenovación, migración, quiescencia y diferenciación. Un modelo sugiere la existencia de dos nichos. Se ha reportado que dentro de la médula ósea muchas HSCs residen cerca de la superficie endosteal, la cual se encuentra cubierta por una capa de células llamadas osteoblastos, sugiriendo así la existencia de un **nicho osteoblástico** donde las HSCs se encuentran ancladas en un estado quiescente (G_0). Por otra parte se sabe que la circulación de HSCs implica que salgan de la médula ósea y entren a torrente sanguíneo (**movilización**) y después regresen a la médula (**homing**). La estructura vascular de médula ósea provee una barrera entre el compartimiento hematopoyético y la circulación periférica. Muchas HSCs permanecen quiescentes en el nicho osteoblástico sin embargo una porción deja este nicho e inicia el proceso de movilización. Estas observaciones sugieren que las células endoteliales sinusoidales tienen el potencial de actuar como un nicho alternativo, llamado **nicho vascular**, promoviendo la proliferación y diferenciación de las HSCs. Ambos nichos desempeñan importantes papeles en regular el proceso de la hematopoyesis. Un modelo propuesto sugiere que las HSCs dejan el nicho osteoblástico, donde se encuentran ancladas y en quiescencia, movilizándose al nicho vascular, donde son inducidas a proliferar y diferenciarse, entrando a la circulación sanguínea atravesando la barrera endotelial (Yin & Li, 2006; Kiel & Morrison, 2008).

Hematopoyesis extramedular

En la etapa adulta la médula ósea es el principal sitio hematopoyético. Cuando elementos de médula ósea benignos son encontrados en un número incrementado en el bazo se le conoce como hematopoyesis extramedular (**HE**). De manera normal la HE se lleva a cabo en ratones aunque en una menor proporción. En la etapa adulta siempre hay un pequeño número de elementos hematopoyéticos maduros en bazo. Al parecer estas células son derivadas de HSC y/o HPCs circulantes que toman lugar y sufren diferenciación terminal o son elementos circulantes maduros que fueron atrapados dentro del bazo o quizás una combinación de ambos eventos. El proceso de HE se puede explicar probablemente porque el microambiente estromal en bazo es lo suficientemente similar al de la médula ósea, lo cual permite el desarrollo de la hematopoyesis (**O'Malley et al., 2005; Brendolan et al., 2007**).

Movilización de células troncales y progenitoras hematopoyéticas

Bajo el estado de equilibrio las HSPCs residen en la médula ósea y circulan en la sangre periférica en números muy bajos (0.01-0.05%) El número de HSPCs en circulación puede ser significativamente incrementado en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo citocinas y/o quimioterapia y señales de estrés **(Greenbaum & Link, 2010)**. Al reclutamiento de HSPCs desde la médula ósea a sangre periférica después de un tratamiento con citocinas y/o quimioterapia se le conoce como **movilización (Lemoli & D'Addio, 2008; Lapidot & Kollet, 2010)**. Condiciones de estrés tales como sangrado, daño e inflamación del tejido hematopoyético y no hematopoyético amplifican e intensifican el proceso de movilización. Las HSPCs son utilizadas en trasplantes autólogos y alogénicos o después de quimioterapia o radioterapia, estas células son capaces de llegar a la médula ósea y reconstituir la hematopoyesis.

Las HSCs se encuentran en la médula ósea en un microambiente, tridimensional altamente organizado, compuesto de una población diversa de células estromales, osteoblastos y osteoclastos, en una matriz extracelular rica en fibronectina, colágenos y proteoglicanos. Un número de moléculas de adhesión de células troncales están potencialmente implicadas en anclar las células troncales al microambiente de médula ósea. Estas incluyen al receptor CXCR4 **(CXCR4)**, el antígeno asociado a la función del leucocito, el antígeno muy tardío-4, c-kit, CD44 y Mac-1. En contraparte el estroma de la médula ósea expresa ligandos para estas moléculas de adhesión incluyendo al factor derivado de células estromales-1 **(SDF-1)**, la molécula de adhesión de célula vascular, el factor estimulador de células troncales **(SCF)**, CD62 y el ácido hialurónico. La interrupción de las interacciones entre las moléculas de adhesión y sus ligandos por citocinas es la base para la movilización de células troncales **(Pusic & DiPersio, 2008)**.

La movilización de HSPCs ha sido inducida clínicamente en humanos o experimentalmente en ratones para trasplantes clínicos **(Nervi et al., 2006)**. Un gran número de factores de crecimiento hematopoyéticos, ciertas quimiocinas y algunos agentes quimioterapéuticos pueden inducir movilización de HSPCs sin embargo las únicas citocinas aprobadas por la FDA **(food and drug administration)** son: el G-CSF **(Filgrastim)** y el GM-CSF **(Sargramostim)** **(Pusic & DiPersio, 2008)**.

Como único agente el G-CSF moviliza más HSCs que GM-CSF, y su combinación no aumenta significativamente el número de células troncales además los efectos secundarios son generados en menor grado. A pesar de existir otros agentes movilizadores, G-CSF es el agente predominante utilizado en la clínica. No obstante se ha observado una pobre movilización de HSPCs en el 25% de los pacientes, particularmente en aquellos con linfomas, mieloma múltiple y leucemia aguda y en el 10-20% de individuos normales **(Pelus, 2008)**.

Recientemente se ha reportado un nuevo agente movilizador llamado AMD3100 **(Plerixaflor, Mozobil)**, un derivado bicíclico antagonista de CXCR4, que actualmente se utiliza en combinación con el G-CSF para movilizar HSPCs cuando el G-CSF no funciona, en 2008 fue autorizado por la FDA **(Kessans et al., 2010)**. Sin embargo aun continua la búsqueda de nuevos agentes movilizadores que puedan funcionar en aquellos individuos donde G-CSF inicialmente falló.

Caseínas y hematopoyesis

En los últimos años se han reportado algunas moléculas con capacidad semejante a las citocinas, capaces de regular la hematopoyesis como: el ácido all-transretinoico (**ATRA**), ampliamente utilizado en la leucemia promielocítica aguda (**Fenaux et al., 2001, 2007**) y algunos componentes de la leche bovina como por ejemplo la caseína (**Ramos et al., 2004, 2008**).

Desde hace más de una década el interés en la investigación ha sido enfocado en identificar componentes biológicamente activos dentro de la leche bovina que regulan al sistema inmune (**Wong & Watson, 1995**). La leche bovina contiene una gran cantidad de proteínas (caseínas, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, lactoferrina y lactoperoxidasa), dentro de las cuales las caseínas son las principales (75-80 %) (**Meisel, 1997**). La caseína, con una baja solubilidad en agua, se encuentra en forma de micelas compuestas por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas α -_{s1}caseína, α -_{s2} caseína, β -caseína y κ -caseína, puede ser diluida en un álcali a pH 6.6 produciendo derivados, altamente solubles en agua, conocidos como caseinatos. El caseinato de sodio (**CasNa**) se obtiene disolviendo caseína en hidróxido de sodio y posteriormente la solución es sometida a una evaporación, con lo cual se obtiene un polvo blanco sin sabor, ni olor, soluble en agua y que además contiene un 65 % de proteínas (**Walstra & Jenneis, 1984**).

Por otra parte se ha reportado que la inyección de **CasNa** o **caseína**, vía intraperitoneal, en ratones, induce la migración de granulocitos a cavidad peritoneal, así como un aumento de G-CSF, GM-CSF (conocidas citocinas movilizadoras) y M-CSF (**Metcalf et al., 1996; Lotem & Sachs, 1985**).

Datos del grupo de trabajo han mostrado que la inyección de CasNa vía intraperitoneal en ratones BALB/c, aumenta el número de células MN en médula ósea **(Martínez, 2006; Silvestre, 2007)**, así como un aumento en el tamaño, peso y celularidad de bazo, parámetros que sugieren activación de la hematopoyesis extramedular **(Lagunes, 2004; Domínguez, 2007)**, lo cual puede involucrar migración de HSCs o HPCs **(O'Malley et al., 2005)**. Este grupo de datos nos hacen pensar que quizás el CasNa podría movilizar HPCs a torrente sanguíneo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Bajo el estado de equilibrio las HSPCs residen en la médula ósea y circulan en la sangre periférica en números muy bajos, este número de células circulantes puede ser significativamente incrementado movilizándolas desde la médula ósea con citocinas y/o quimioterapia (**Lemoli & D'Addio, 2008; Lapidot & Kollet, 2010**). En la actualidad algunas citocinas como el G-CSF y el GM-CSF son utilizadas clínicamente para movilizar HSPCs a sangre periférica (**Pusic & DiPersio, 2008**).

Datos de nuestro laboratorio muestran que la inyección de CasNa, vía intraperitoneal en ratones, aumenta el número de células MN en bazo (**Lagunes, 2004; Domínguez, 2007**), un evento que puede implicar migración de HSCs o HPCs (**O'malley et al., 2005**); además se ha reportado que induce una migración de granulocitos a cavidad peritoneal así como un aumento en los niveles de G-CSF y GM-CSF (**Metcalf et al., 1996**) sin embargo se desconoce si la inyección de CasNa tendrá la capacidad para movilizar HPCs a torrente sanguíneo.

HIPÓTESIS

El CasNa activa la hematopoyesis en médula ósea y posiblemente la hematopoyesis extramedular en bazo, un evento que podría implicar movilización de células progenitoras hematopoyéticas. Considerando además que el CasNa induce migración de granulocitos a cavidad peritoneal y aumenta los niveles de G-CSF y GM-CSF (conocidos movilizadores), se espera que promueva la movilización de células progenitoras hematopoyéticas a sangre periférica en un modelo de ratón.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del CasNa sobre la movilización de células progenitoras hematopoyéticas.

Objetivos particulares

.- Evaluar el número de células MN en médula ósea, bazo y sangre periférica de ratones tratados con o sin CasNa.

.- Evaluar el número de células progenitoras hematopoyéticas en médula ósea, bazo y sangre periférica de ratones tratados con o sin CasNa.

.- Determinar el inmunofenotipo de las células MN obtenidas de la médula ósea, bazo y sangre periférica de ratones tratados con o sin CasNa.

MATERIAL Y MÉTODO

Tratamiento de los ratones y aislamiento de las células MN

Ratones hembra BALB/c (**n=12**), obtenidas del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de 2-3 meses de edad fueron mantenidas con alimento y agua en condiciones *ad libitum*. Como previamente lo había hecho Lagunes en el 2004, dos ratones fueron inyectados, vía intraperitoneal, cada 48 h durante 6 días con sólo 1 ml de solución inyectable, vehículo (**Veh**) y dos más con 1 ml de CasNa (Spectrum, New Brunswick, NJ) (0.1g/ml en agua milli-Q), 24 h después de la última inyección los animales fueron anestesiados con éter, se obtuvo la sangre del plexo axilar, cuando murieron se obtuvieron fémures y bazo, posteriormente se aislaron las células MN mediante un método de gradiente de densidad empleando ficoll ($\delta=1.077\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo).

Evaluación del número y viabilidad celular

Después de obtener las células MN se evaluó el número celular realizando un conteo en el hemocitómetro bajo el microscopio a 10 X. Para evaluar la viabilidad se utilizó una prueba de exclusión al azul tripano (Sigma, St Louis, Mo) la cual consistió en tomar una muestra de células adicionándoles el colorante en una proporción 1:1 para finalmente contar las células vivas y muertas (teñidas con azul tripano) obteniendo así el porcentaje de viabilidad.

Determinación del índice esplénico

Antes del sacrificio los ratones fueron pesados y el valor fue registrado. Después de extraer el bazo fue pesado y con estos datos se calculó el índice esplénico con la siguiente fórmula.

$$\text{Índice esplénico} = \frac{\text{Peso del bazo}}{\text{Peso del ratón}}$$

Evaluación de HPCs

Para evaluar el número de HPCs en médula ósea, bazo y sangre periférica, las células MN aisladas de ratones inyectados con CasNa o Veh fueron cultivadas, en cajas petri de 35 mm x 10 mm (Corning, NY, USA), a una densidad de 3×10^4 cél/ml (médula ósea) y 3×10^5 cél/ml (bazo y sangre periférica), en un medio semisólido (Methocult; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá), el cual contenía un cóctel de factores de crecimiento, tales como: factor estimulador de células tallo recombinante de ratón (**rmSCF**), interleucina-3 recombinante de ratón (**rmIL-3**), interleucina-6 recombinante humana (**rhIL-6**) y eritropoyetina recombinante humana (**rhEpo**). Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de 37°C, 5 % de CO₂ y humedad a punto de rocío durante 12 días para médula ósea y 14 días para bazo y sangre periférica. Al término de los cultivos se evaluó el número de UFCs mediante un conteo bajo el microscopio a 10 X. El criterio considerado para determinar el linaje de cada colonia fue de acuerdo a lo descrito en el manual “ensayos para células formadoras de colonias de ratón usando methocult” (Methocult; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá).

Determinación del inmunofenotipo de células MN

Después de aislar las células MN de médula ósea, bazo y sangre periférica se tiñeron con los siguientes anticuerpos: sólo **anti c-kit (clona 2B8)** conjugado con ficoeritrina **(PE) (eBioscience, San Diego, CA, USA)** y **anti Sca-1(clona D7)** conjugado con alofococianina **(APC) (eBioscience)** o c-kit y Sca-1 más un cóctel de anticuerpos del linaje hematopoyético **(lin)** biotinilados [**CD3 (clona 145-2C11)**, **CD45R/B220 (clona RA3-6B2)**, **CD11b (clona M1/70)**, **TER-119**, **Ly-6G (clona RB6-8C5)] (eBioscience)** más **estreptavidina** conjugada con el complejo proteína clorofila peridina-Cy5.5 **(PerCP-Cy5.5) (eBioscience)**. El exceso de anticuerpos fue removido mediante lavados con PBA, por último las células fueron fijadas con paraformaldehído. El análisis se llevo a cabo en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) con el software BD Cell Quest Pro v.5.1.1. (Becton Dickinson). Se leyeron 5×10^5 eventos para cada muestra. El análisis de los datos se realizó a partir de la región linfo-mieloide, determinada por la granularidad y tamaño de cada muestra, enseguida se evaluó la expresión del marcador lin, tomando la región negativa, posteriormente se evaluó la doble expresión de c-kit y Sca-1. En un ensayo similar al anterior se evaluó la expresión de c-kit y Sca-1, con la única diferencia que no se usó el marcador lin.

Manejo de datos

En el presente estudio se realizaron al menos tres experimentos por separado. Los datos se presentaron como la media \pm la desviación estándar. Para observar diferencias significativas entre los datos se empleó una prueba T de student ($p < 0.05$) mediante el paquete estadístico SPSS 17.0.

RESULTADOS

El CasNa aumenta el número de células mononucleadas en médula ósea y bazo sin afectar la viabilidad.

Ratones BALB/c fueron inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml) o 1 ml de solución inyectable (**Veh**) por vía intraperitoneal cada 48 h durante 6 días, al séptimo día los ratones fueron sacrificados para obtener las células de médula ósea, bazo y sangre periférica, las células mononucleadas (**MN**) fueron separadas por un gradiente de densidad, se evaluó el número por conteo celular y la viabilidad mediante exclusión al azul tripano. Los resultados muestran que en los ratones tratados con CasNa, existe un aumento significativo en el número de células MN de médula ósea (**Figura 4A**) y de bazo (**Figura 4B**) en comparación con los ratones Veh. En sangre periférica se observó la misma tendencia aunque el aumento no es significativo (**Figura 4C**). La viabilidad de las células MN provenientes de los tres tejidos, independientemente del tratamiento, es mayor al 90 % (**Figura 5A, B y C**).

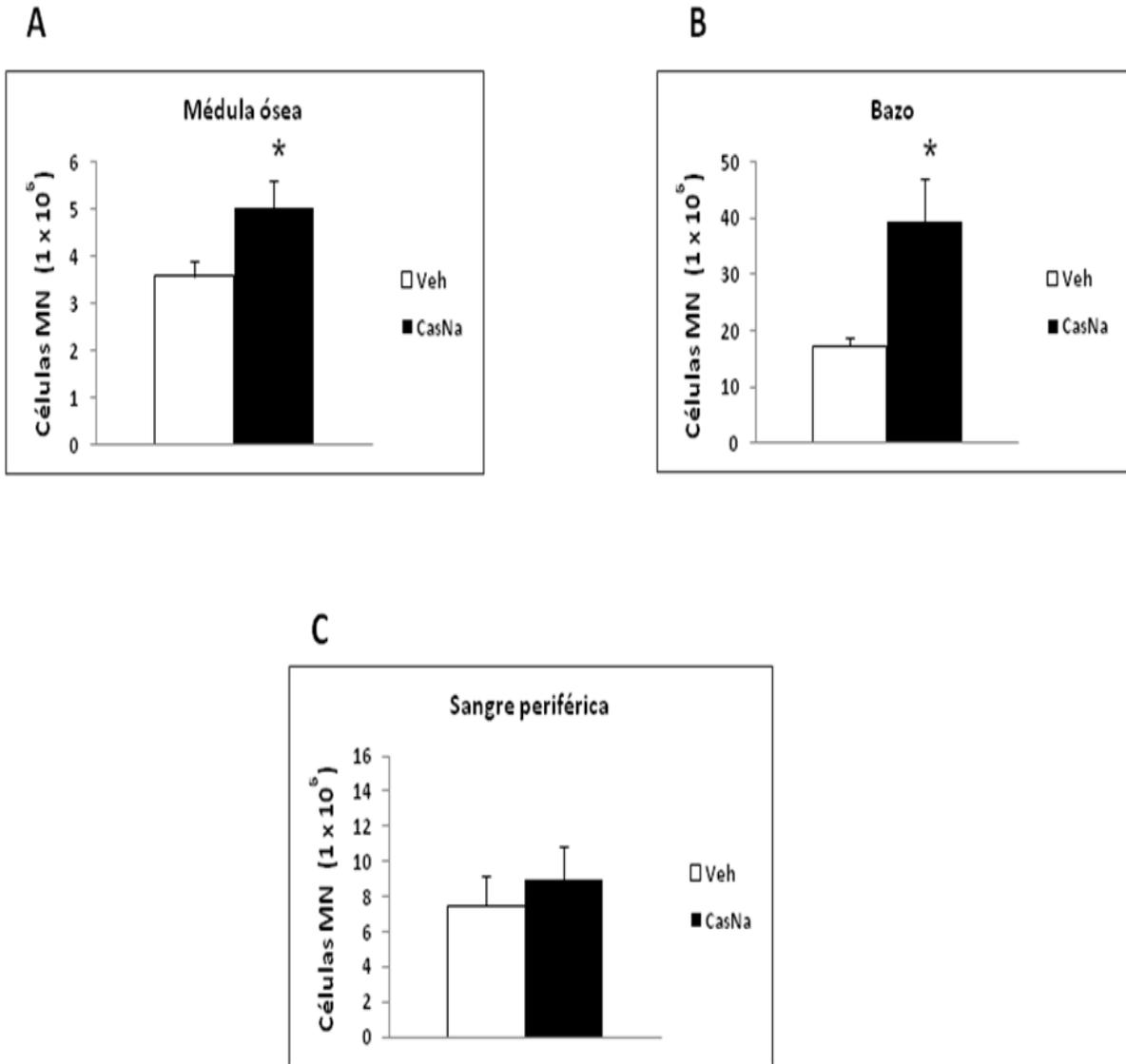


Figura 4. Número de células MN. (A) médula ósea, (B) bazo y (C) sangre periférica. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), n=12. *Diferencia significativa con respecto al Veh ($P < 0.05$). Los valores reportados para médula, bazo y sangre se obtuvieron a partir de un pool de 4 fémures, dos bazos y 0.7ml de sangre para cada condición.

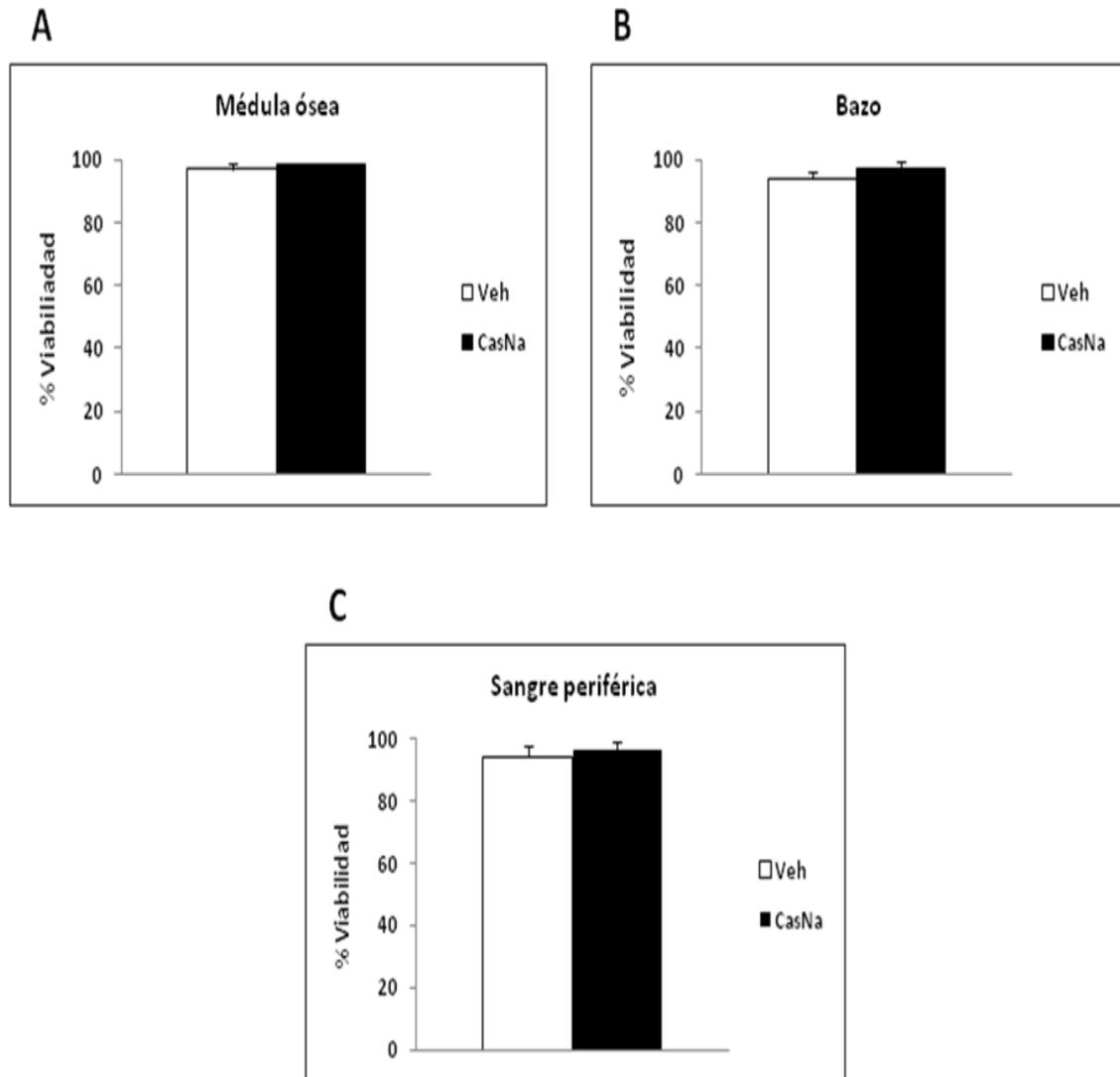


Figura 5. Porcentaje de viabilidad de células MN. (A) médula ósea, (B) bazo y (C) sangre periférica. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1ml de CasNa (0.1g/ml), n=12. *Diferencia significativa con respecto al Veh (P<0.05).

El índice esplénico se aumenta en ratones tratados con CasNa

Después de sacrificar a los ratones y al momento de obtener el bazo, se observó un aumento en el tamaño del bazo de aquellos ratones tratados con CasNa comparado con los ratones Veh. Al determinar el tamaño, peso e índice esplénico (peso del bazo/peso del ratón) se observó un aumento significativo de casi dos veces, de estos parámetros, en aquellos ratones inyectados con CasNa en comparación con los ratones Veh (**Tabla 2**).



Tratamiento de ratones	Índice esplénico
Vehículo	0.00476 ± 0.0003
CasNa	0.00877 ± 0.0006 *

Tabla 2. Índice esplénico. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), n=12. *Diferencia significativa con respecto al Veh (P<0.05).

El CasNa aumenta el número de células progenitoras en bazo y sangre periférica.

Con la finalidad de observar si el CasNa además de aumentar el número de células MN también aumentaba el número de células progenitoras decidimos evaluar su potencial para formar colonias. Las células de los tres tejidos fueron cultivadas en metilcelulosa suplementado con citocinas [factor estimulador de células tallo recombinante de ratón (**rmSCF**), interleucina-3 recombinante de ratón (**rmIL-3**), interleucina-6 recombinante humana (**rhIL-6**) y eritropoyetina recombinante humana (**rhEpo**)], durante 11 días para médula ósea (3×10^4 cél/ml) y 14 días para bazo y sangre periférica (3×10^5 cél/ml). Al contar el número de unidades formadoras de colonias (**UFCs**), no se observaron diferencias significativas en médula ósea de ratones tratados con CasNa respecto a los ratones Veh sin embargo cuando analizamos los diferentes tipos de colonias observamos que había un aumento significativo en el número de colonias de granulocitos (**Figura 6A**). En el bazo de ratones tratados con CasNa se observó un incremento de casi el doble en el número de colonias totales y un importante aumento en las colonias de macrófagos en comparación a los ratones Veh (**Figura 6B**). Por último, el CasNa, en sangre periférica indujo un aumento de 6 veces en el número de colonias totales, mientras que las UFCs de granulocitos, macrófagos y eritrocitos también aumentaron significativamente con respecto a las colonias de la sangre de ratones Veh (**Figura 6C**).

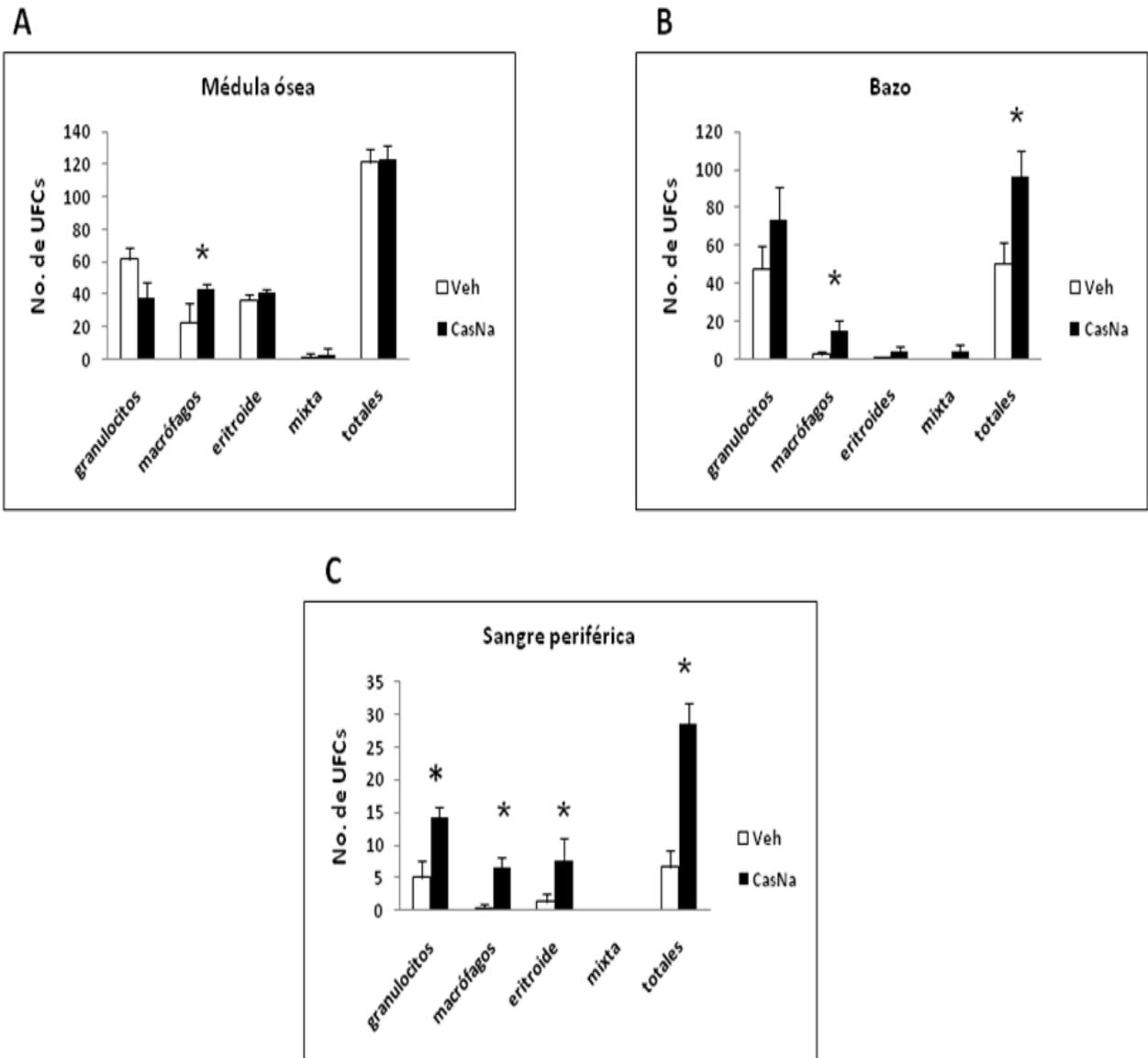
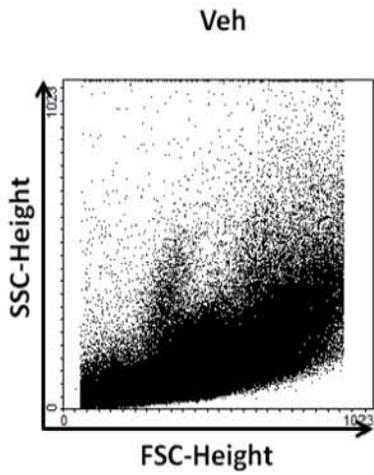


Figura 6. Número de UFCs. (A) médula ósea, (B) bazo y (C) sangre periférica. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), n=12. *Diferencia significativa con respecto al Veh (P<0.05).

La población Lin-, Sca-1 bajo y c-kit alto se incrementa en el bazo y sangre periférica de ratones tratados con CasNa.

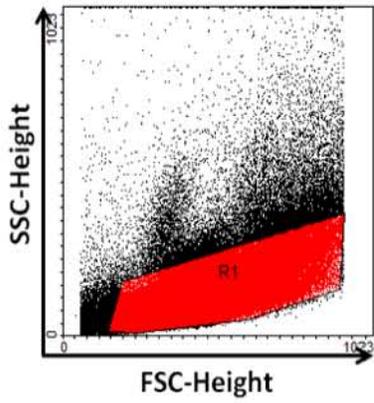
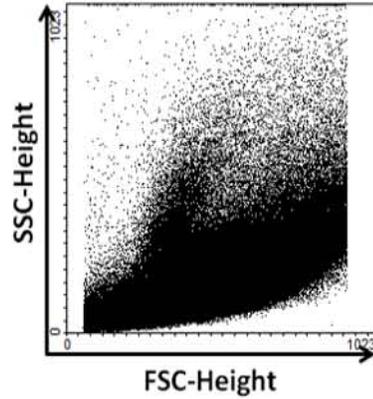
Una vez que evaluamos la presencia de células progenitoras en médula ósea, bazo y sangre periférica, se procedió a evaluar su inmunofenotipo mediante la expresión de antígenos de superficie específicos para células progenitoras hematopoyéticas. Las células MN fueron fijadas y teñidas con anti-Lin, anti-Sca-1 y anti-c-kit. En cada tejido se eligió, a partir de la granularidad y tamaño, una región linfomieloide, posteriormente se evaluó la expresión de Lin, enseguida se eligió la región negativa y después se evaluó la doble expresión de Sca-1 y c-kit, a esta nueva población se le dividió en regiones y por último se determinó el porcentaje de células positivas en cada región seleccionada. En médula ósea observamos que el CasNa aumentó 2.2 veces la población Lin- (negativo), Sca-1 alto/c-kit alto (región 7, 1.32%) comparado con ratones Veh (región 7, 0.58%) **(Figura 7)**. En bazo se observó con CasNa un aumento de 2.3 veces en la población Lin-, Sca-1 alto/c-kit- (región 3, 12.83%) con respecto al Veh (región 3, 5.42%) y un incremento de 3.5 veces en la población Lin-, Sca-1 bajo/c-kit alto (región 6, 1.98%) en comparación con el Veh (región 6, 0.56%) **(Figura 8)**. Mientras que en sangre periférica se observó con CasNa un incremento de casi el doble en la población Lin-, Sca-1 bajo/c-kit alto (región 5, 0.25%) con respecto al Veh (región 5, 0.14%) **(Figura 9)**.



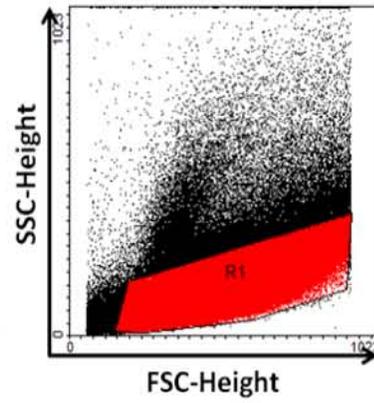
MÉDULA ÓSEA

CasNa

Granularidad y tamaño
500,000 eventos



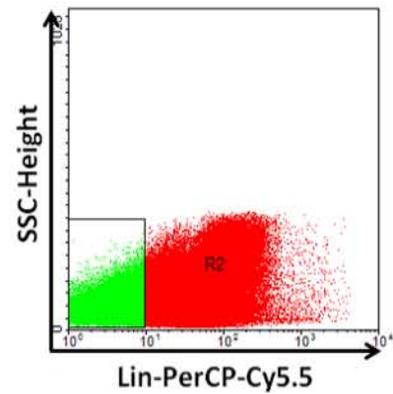
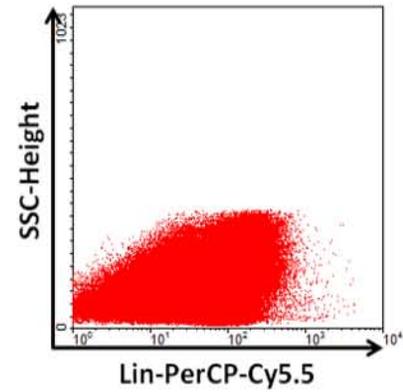
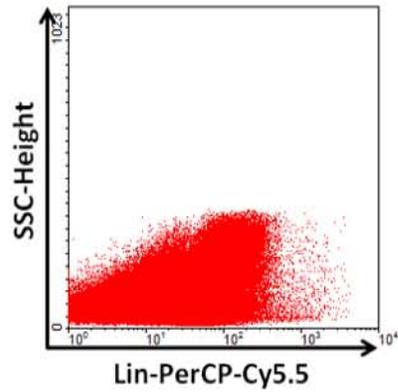
Región linfomieloide
500,000 eventos



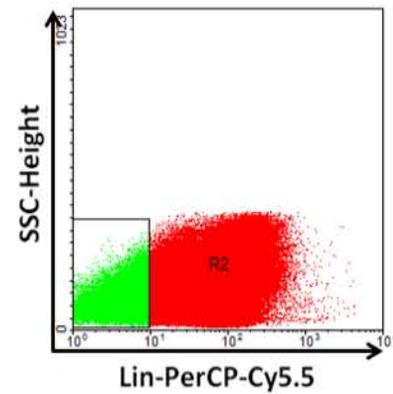
Veh

CasNa

Positividad a Lin-PerCP-Cy5.5



Región Lin negativa



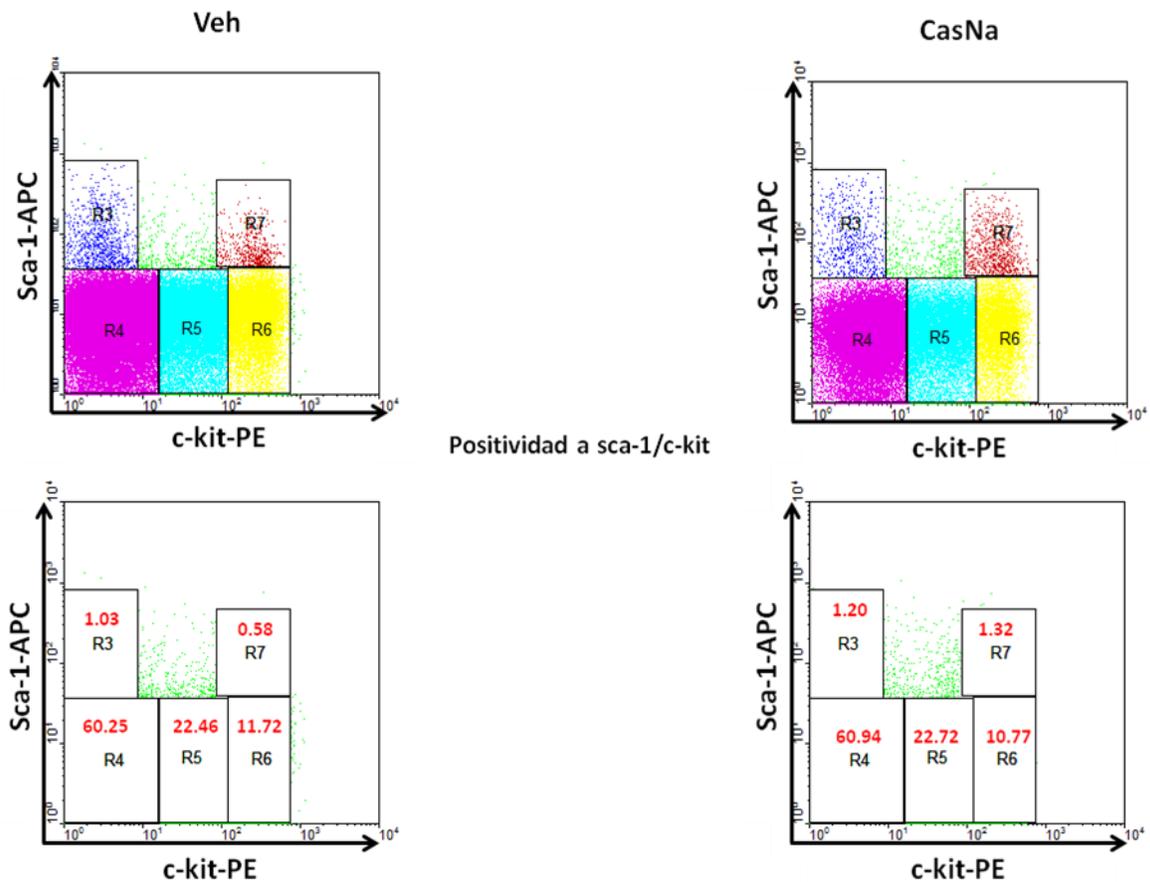
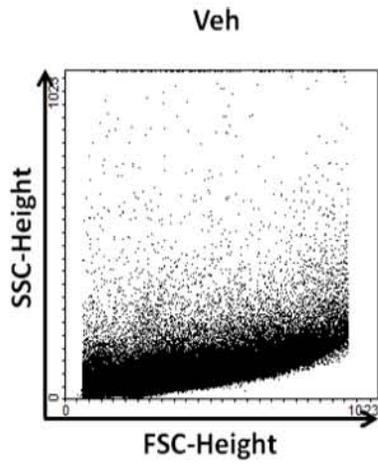
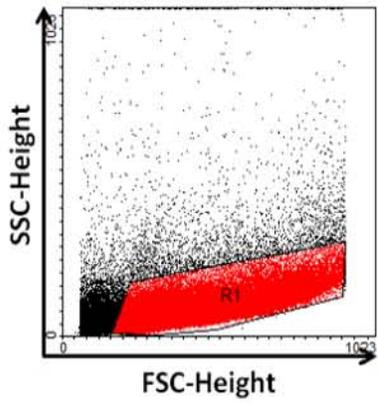
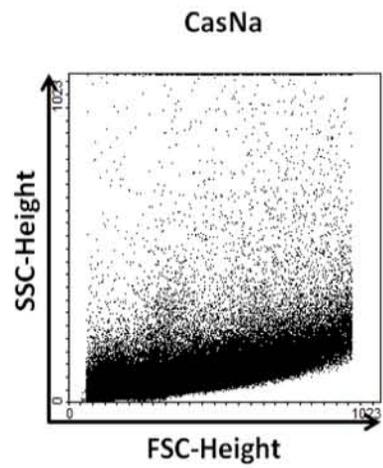


Figura 7. Expresión de Lin, Sca-1 y c-kit en células MN de médula ósea. A partir de la granularidad y tamaño, de la población total, se eligió una región linfomieloide, enseguida se evaluó la positividad para Lin, se determinó la región negativa para Lin y posteriormente se evaluó la doble positividad para Sca-1 y c-kit, finalmente se determinaron regiones en esta nueva población y se obtuvieron los porcentajes correspondientes. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), n=12.

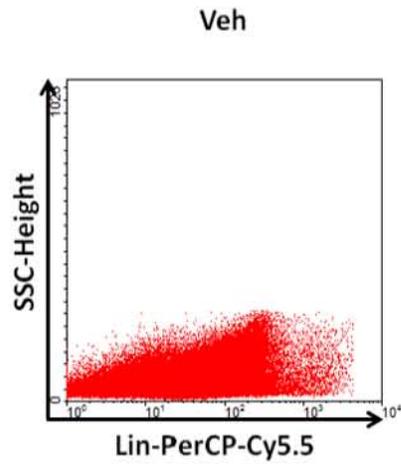
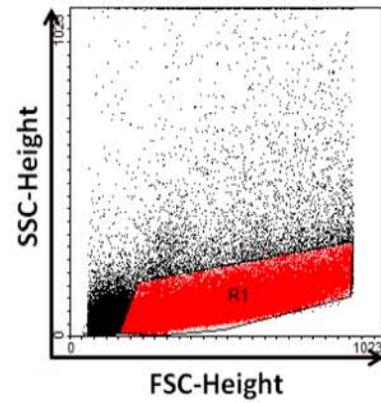


BAZO

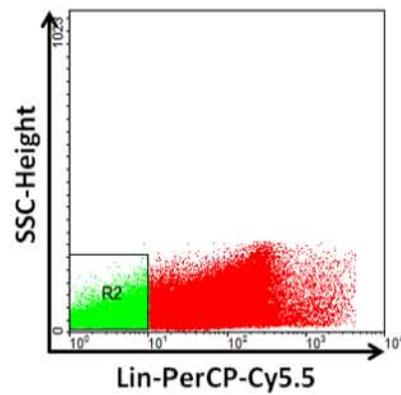
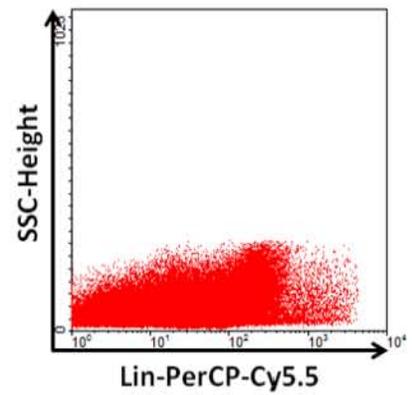
Granularidad y tamaño
500,000 eventos



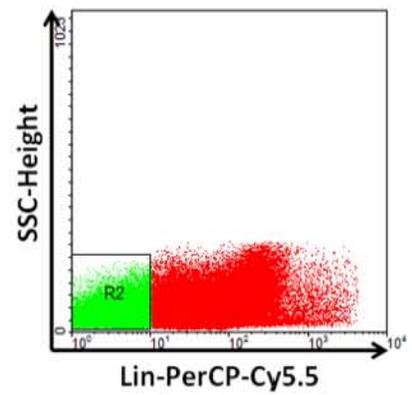
Región linfomieloide
500,000 eventos



Positividad a Lin-PerCP-Cy5.5



Región Lin negativa



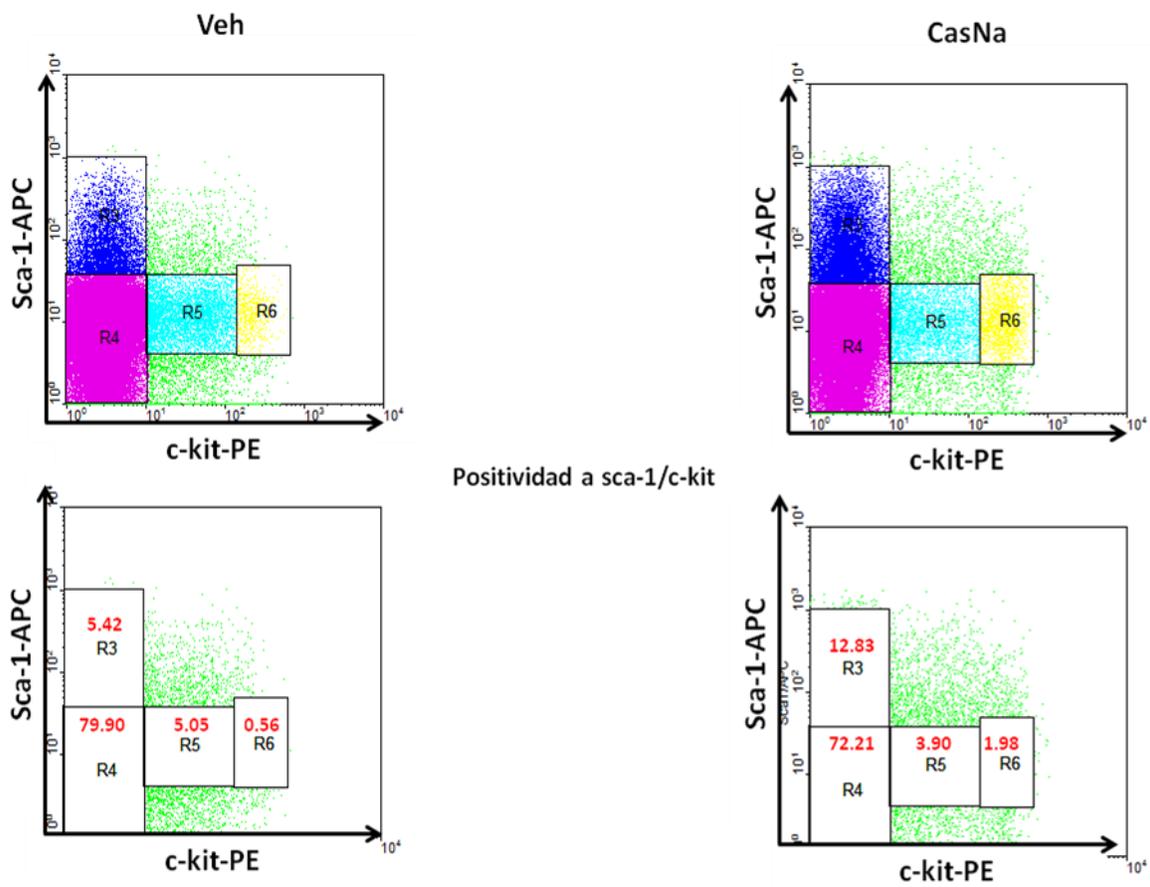
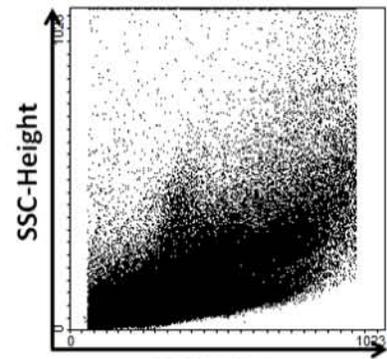
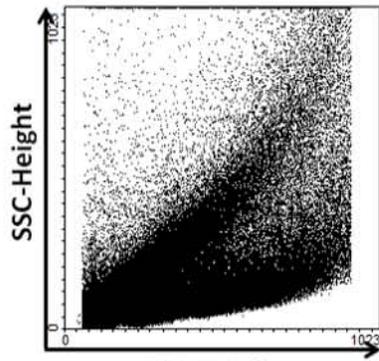


Figura 8. Expresión de Lin, Sca-1 y c-kit en células MN de bazo. A partir de la granularidad y tamaño, de la población total, se eligió una región linfomieloide, enseguida se evaluó la positividad para Lin, se determinó la región negativa para Lin y posteriormente se evaluó la doble positividad para Sca-1 y c-kit, finalmente se determinaron regiones en esta nueva población y se obtuvieron los porcentajes correspondientes. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), n=12.

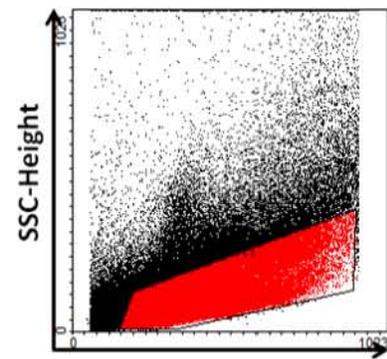
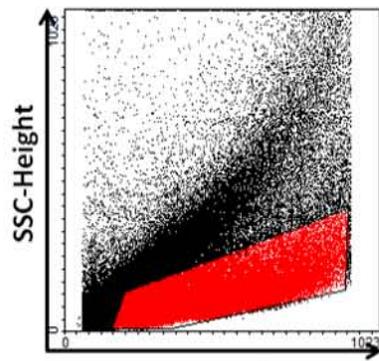
Veh

SANGRE PERIFÉRICA

CasNa



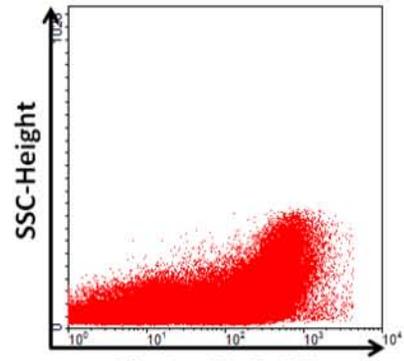
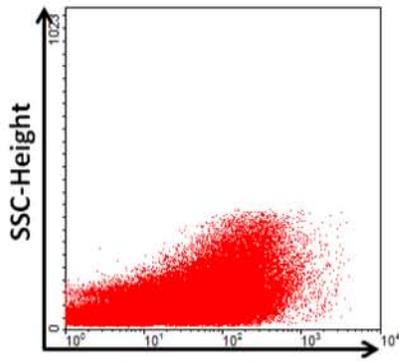
Granularidad y tamaño
500,000 eventos



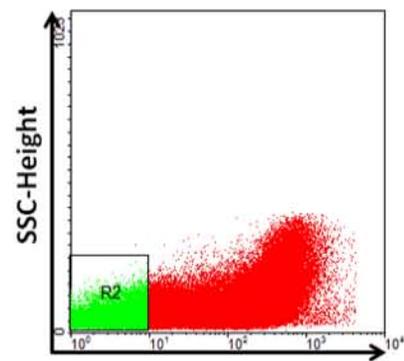
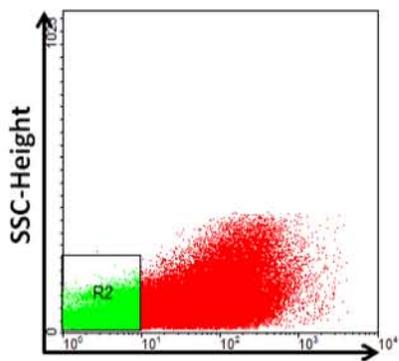
Región linfomieloide
500,000 eventos

Veh

CasNa



Positividad a Lin-PerCP-Cy5.5



Región Lin negativa

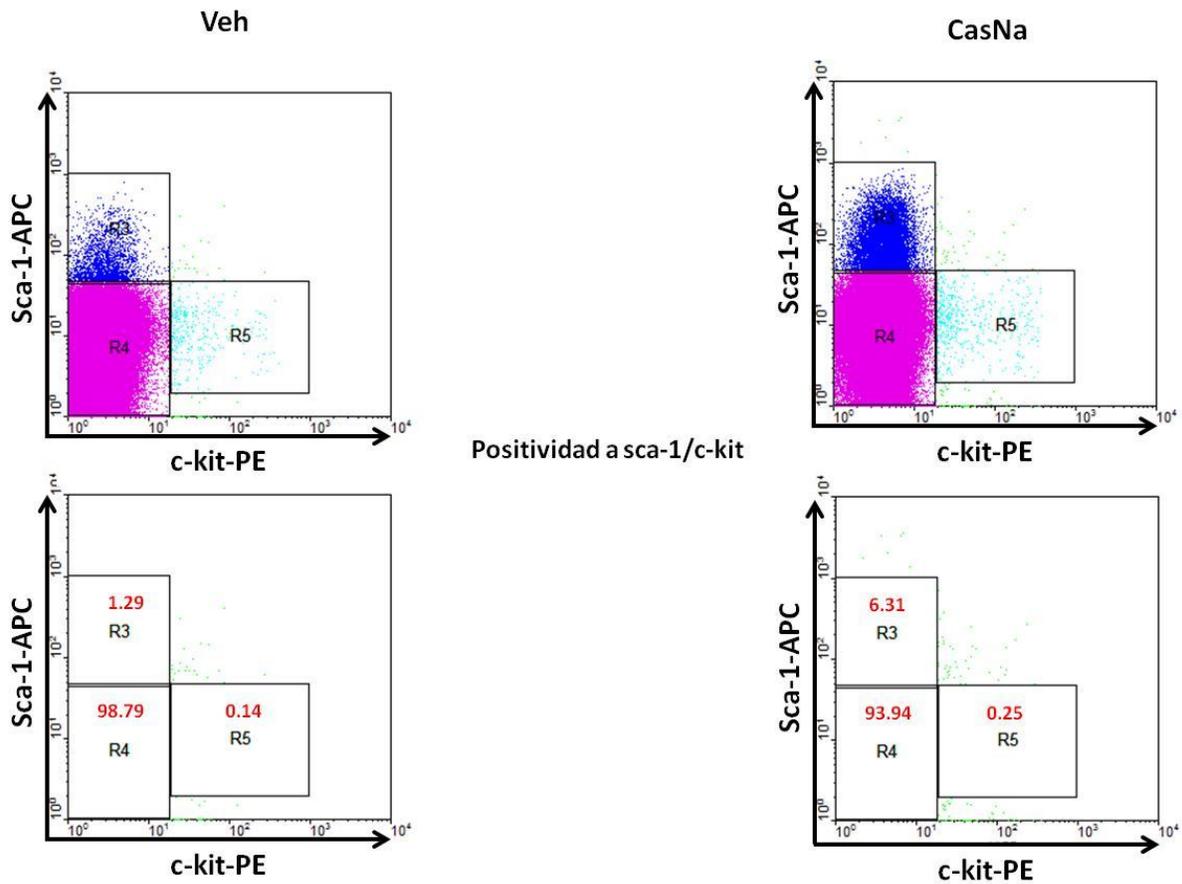


Figura 9. Expresión de Lin, Sca-1 y c-kit en células MN de sangre periférica. A partir de la granularidad y tamaño, de la población total, se eligió una región linfomieloide, enseguida se evaluó la positividad para Lin, se determinó la región negativa para Lin y posteriormente se evaluó la doble positividad para Sca-1 y c-kit, finalmente se determinaron regiones en esta nueva población y se obtuvieron los porcentajes correspondientes. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), n=12.

La población Sca-1 bajo y c-kit alto se incrementa en el bazo y sangre de ratones tratados con CasNa

Después de evaluar la expresión de Lin, Sca-1 y c-kit en las células MN de los tres tejidos, realizamos otro experimento, similar al anterior, omitiendo ahora el marcador Lin. De igual manera para los tres tejidos se escogió la región linfomieloide, a partir de la granularidad y tamaño, después se evaluó la doble positividad para Sca-1 y c-kit, la población fue dividida en regiones y posteriormente se determinó el porcentaje de células positivas en cada región seleccionada. Los resultados muestran que en la médula ósea de ratones tratados con CasNa existe un aumento de casi tres veces en el porcentaje de células Sca-1 alto/c-kit alto (región 6, 0.44%) con respecto a los ratones Veh (región 6, 0.15%) **(Figura 10)**. En bazo con CasNa se muestra un aumento de 1.2 veces en las células Sca-1 alto/c-kit- (región 2, 2.43%) en comparación con el Veh (región 2, 1.89%) y un aumento de casi 4 veces de la población Sca-1 bajo/c-kit alto (región 5, 1.45%) con respecto al Veh (región 5, 0.37%) **(Figura 11)**. Finalmente en sangre periférica se observa un importante incremento de 5 veces en la población Sca-1 bajo/c-kit alto (región 4, 1.11%) comparado con los ratones Veh (región 4, 0.22%) **(Figura 12)**.

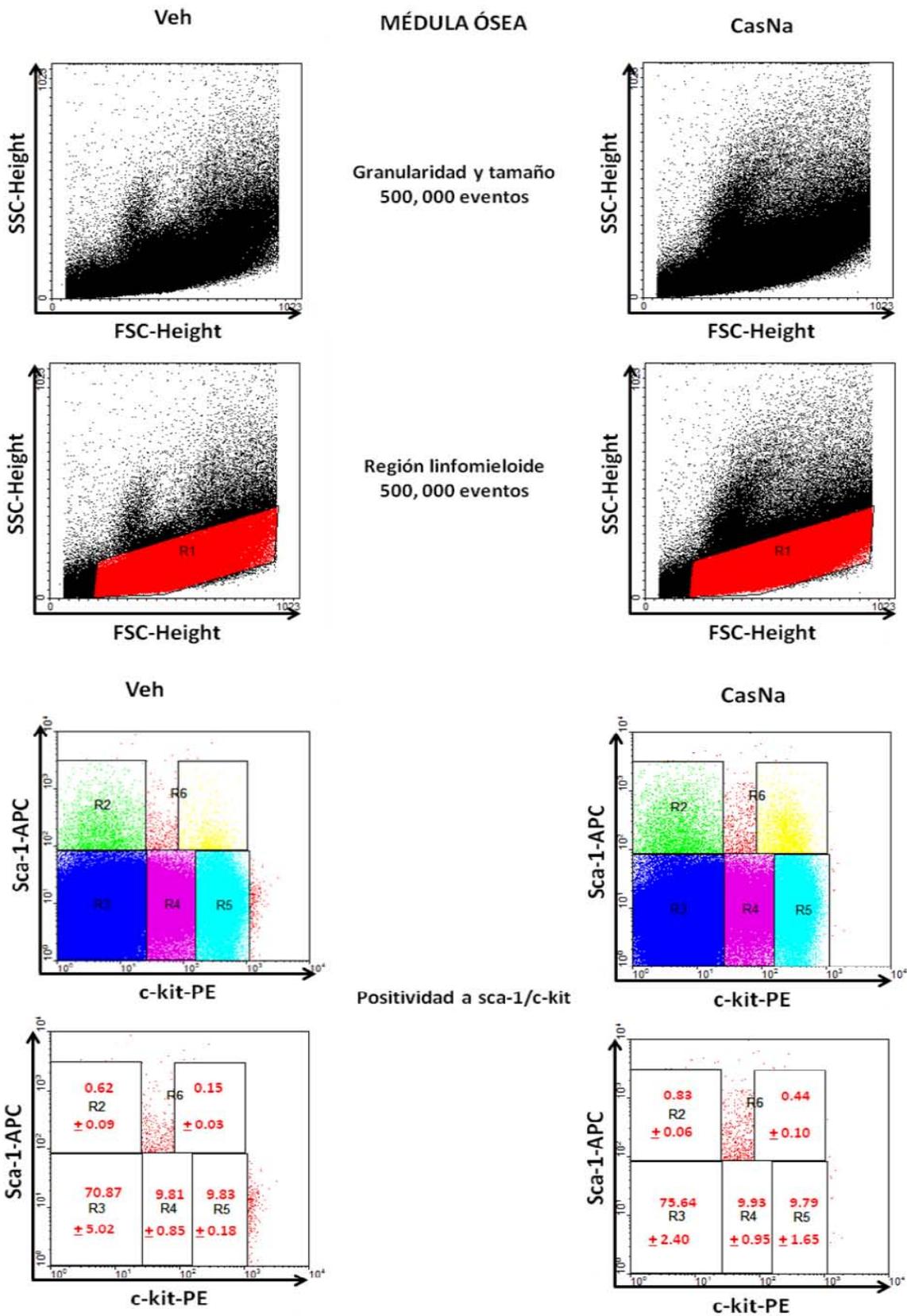


Figura 10. Expresión de Sca-1 y c-kit en células MN de médula ósea. A partir de la granularidad y tamaño de la población total se eligió una región linfomieloide, enseguida se evaluó la doble positividad para Sca-1 y c-kit, finalmente se determinaron regiones y se obtuvieron los porcentajes correspondientes. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), n=12.

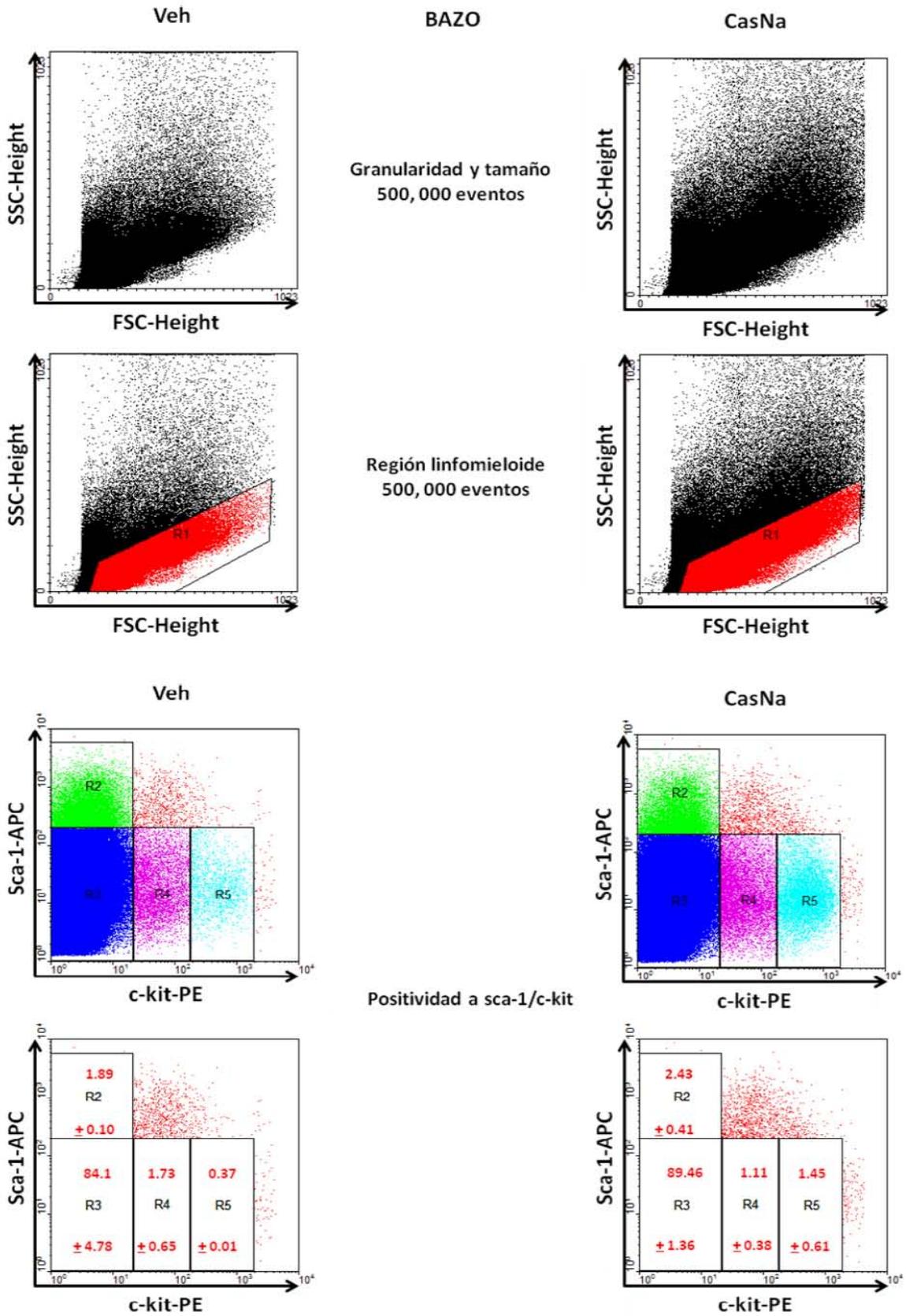


Figura 11. Expresión de Sca-1 y c-kit en células MN de bazo. A partir de la granularidad y tamaño de la población total se eligió una región linfomieloide, enseguida se evaluó la doble positividad para Sca-1 y c-kit, finalmente se determinaron regiones y se obtuvieron los porcentajes correspondientes. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), n=12.

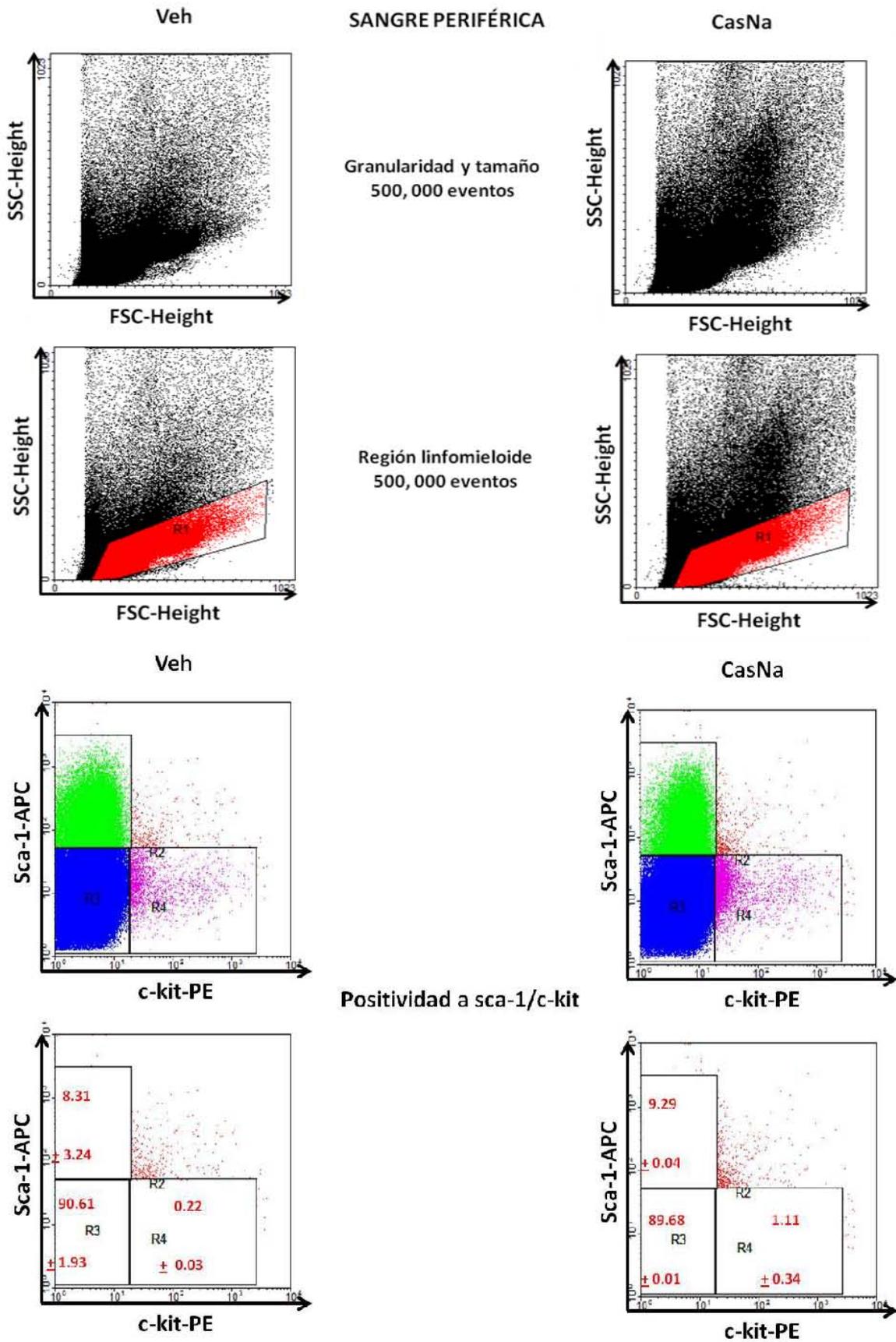


Figura 12. Expresión de Sca-1 y c-kit en células MN de sangre periférica. A partir de la granularidad y tamaño de la población total se eligió una región linfomieloide, se evaluó la doble positividad para Sca-1 y c-kit, posteriormente se determinaron regiones y se obtuvieron los porcentajes correspondientes. Veh, ratones inyectados con 1 ml de solución inyectable; CasNa, ratones inyectados con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), n=12.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La hematopoyesis es un proceso por el cual son generadas las células sanguíneas a partir de una HSC (**Mayani et al., 2007**). Este proceso es regulado por un tipo de proteínas llamadas citocinas (**Barreda et al., 2004**). En ratones la hematopoyesis se lleva a cabo principalmente en la médula ósea sin embargo en bazo existe una pequeña generación de células sanguíneas, a este tipo de hematopoyesis fuera de la médula ósea se le conoce como hematopoyesis extramedular, este evento puede ser consecuencia de una migración de HSCs o HPCs circulantes que se alojaron y sufrieron proliferación y diferenciación terminal o probablemente una combinación de ambos eventos (**O'malley et al., 2005**). Las HSPCs durante el estado de equilibrio se encuentran en sangre periférica en números muy bajos sin embargo bajo condiciones de estrés tales como sangrado, inflamación y daño al tejido hematopoyético o después de un tratamiento con citocinas y/o quimioterapia, las HSPCs son reclutadas desde médula ósea a torrente sanguíneo aumentando su número en circulación, un evento conocido como **movilización (Lapidot & Kollet, 2010)**.

Algunos trabajos en años recientes muestran que existen otras moléculas diferentes a las citocinas con la capacidad de regular la hematopoyesis, tal es el caso del ATRA (**Fenaux et al., 2001, 2007**) y la caseína (**Ramos et al., 2004, 2008**). Se ha reportado que la inyección de CasNa (una sal derivada de la caseína) por vía intraperitoneal en ratones, promueve la migración de granulocitos a cavidad peritoneal además de aumentar los niveles de G-CSF y GM-CSF (conocidas citocinas movilizadoras) (**Metcalf et al., 1996**). Por otra parte datos de nuestro grupo de trabajo muestran que la inyección de CasNa aumenta el peso, tamaño y celularidad de bazo (**Lagunes, 2004; Domínguez, 2007**), parámetros que sugieren activación de la hematopoyesis extramedular, un evento que puede implicar migración de HSCs o HPCs de médula ósea a bazo. El conjunto de datos reportados anteriormente por la literatura y nuestro grupo de trabajo nos llevó a preguntarnos si el CasNa podría estar induciendo la movilización de HPCs a sangre periférica.

En el presente trabajo, el primer experimento que realizamos fue evaluar el efecto del CasNa sobre la celularidad de médula ósea, bazo y sangre periférica. Nuestros resultados muestran que la inyección de CasNa cada 48 h durante 6 días, aumenta significativamente el número de células MN en médula ósea (**Figura 4A**), y bazo (**Figura 4B**), mientras que en sangre periférica se observa un aumento pero no es significativo (**Figura 4C**). La viabilidad celular fue más del 90% independientemente del tejido (**Figura 5**), lo cual muestra que el CasNa no daña a las células MN. El aumento de la celularidad en médula ósea, inducido por el CasNa, es un parámetro considerado como evidencia de activación medular de la hematopoyesis (**Donahue et al., 1986**). Estos primeros resultados indican que el CasNa por lo menos esta activando la hematopoyesis medular, mientras que el aumento en el tamaño y celularidad del bazo sugieren una activación extramedular de la hematopoyesis.

Considerando lo anterior y después de haber observado un aumento en la celularidad de médula ósea, bazo y sangre periférica, aunque no fue significativo en este último tejido, nos preguntamos si tal incremento se debía a un aumento de células progenitoras o por una acumulación de células maduras. El cultivo de células MN en un medio semisólido (metilcelulosa) nos permitió detectar células progenitoras a partir de la formación de UFCs (**Broxmeyer et al., 2006**). Los datos muestran que células MN de médula ósea obtenidas de ratones tratados con CasNa, en comparación con los ratones vehículo, no mostraron cambios significativos en el número de UFCs totales (**Figura 6A**), mientras que en bazo se elevó al doble (**Figura 6B**) y en sangre periférica se quintuplico (**Figura 6C**). El aumento de progenitores en bazo indica una activación de la hematopoyesis extramedular (**Khaldoyanidi et al., 2003**), lo cual se correlaciona con el aumento de células MN, tamaño y peso de bazo, mientras que el aumento de progenitores en sangre periférica sugiere un evento de movilización.

La movilización clínica de HSPCs comúnmente se realiza mediante la administración de G-CSF. Se ha observado que en la médula ósea de individuos sanos la población de células MN se ve aumentada contrastando con la disminución de células progenitoras (**Martinez et al., 1999**); el tamaño del bazo también se ve incrementado y regresa a la normalidad pocos días después del tratamiento (**Stroncek et al., 2004**); la celularidad en sangre periférica aumenta considerablemente siendo enriquecida en la población de células troncales/progenitoras (**Pusic & DiPersio, 2008**). Nosotros mostramos que la inyección de CasNa induce una actividad biológica similar a la observada con G-CSF, ya que aumenta el número de HPCs en bazo y sangre periférica con la diferencia que en médula ósea no altera la población de HPCs lo anterior sugiere que el CasNa podría ser una molécula con propiedades de agente movilizador.

Una vez que evaluamos la presencia de células progenitoras en los tres tejidos nos preguntamos si el inmunofenotipo se relacionaba con lo reportado en la literatura para células progenitoras mieloides. Para tal fin empleamos anticuerpos dirigidos contra Lin, c-kit y Sca-1, marcadores específicos para HSPCs (**Yeung & So, 2009**). Los resultados revelaron que en la médula ósea de ratones inyectados con CasNa se aumentó al doble la población de células Lin-, Sca-1 alto/c-kit alto comparado con ratones vehículo (**Figura 7**). En bazo se observó un incremento de 3.5 veces en la población Lin-, Sca-1 bajo, c-kit alto (**Figura 8**). Al evaluar la sangre periférica se observó un incremento de casi el doble en la población Lin-, Sca-1 bajo, c-kit alto (**Figura 9**). Los datos obtenidos muestran que estos inmunofenotipos encontrados en los diferentes tejidos, son similares al de células progenitoras mieloides (**Challen et al., 2009**).

C-kit es un receptor tirosina cinasa tipo III, su papel está asociado al mantenimiento y sobrevivencia de HSCs y células mast, es expresado en HSCs, células progenitoras mieloides, células dendríticas, células mast, células pro-B y pro-T pero se pierde en la diferenciación de las células B y T, por lo que c-kit es utilizado en conjunto con otros marcadores como Sca-1 y Lin, para la identificación de HSPCs (**Ray et al., 2008**).

Sca-1 es una proteína de superficie celular anclada a fosfatidil-inositol glicosil, que pertenece a la familia del gen Ly6, su función es desconocida, es expresado principalmente en HSCs de ratón, linfocitos T maduros y otros tipos celulares de origen hematopoyético distinto, Sca-1 es usado rutinariamente en combinación con otros marcadores para el enriquecimiento de células troncales/progenitoras hematopoyéticas (**Holmes & Stanford, 2007**). Por otro lado, la literatura dice que para identificar células troncales o progenitoras hematopoyéticas es necesario el marcador Lin (**Yeung & So, 2009**) sin embargo nosotros pensamos que no es necesario puesto que ninguna célula precursora o madura expresa al mismo tiempo c-kit o Sca-1, por lo que ambos marcadores pueden ser suficientes para identificar poblaciones de células troncales/progenitoras. Para comprobar lo anterior realizamos un experimento bajo las mismas condiciones utilizando solamente anticuerpos dirigidos contra c-kit y Sca-1. Los datos muestran que en la médula ósea de ratones tratados con CasNa existe un aumento de casi tres veces en el porcentaje de células Sca-1 alto/c-kit alto (**Figura 10**), en bazo hay un aumento de casi 4 veces en la población Sca-1 bajo/c-kit alto (**Figura 11**), mientras que en sangre periférica se observó un incremento de 5 veces en la población Sca-1 bajo/c-kit alto (**Figura 12**). Los datos anteriores conservan la misma tendencia de un incremento en las poblaciones de células Lin-, c-kit alto y Sca-1 bajo, un inmunofenotipo similar al de progenitores mieloides hematopoyéticos, en los tres tejidos evaluados, en comparación a cuando incluimos Lin, aunque con porcentajes diferentes. Los resultados aquí mostrados sugieren que c-kit y Sca-1 pueden ser marcadores suficientes para identificar por lo menos HPCs.

Hasta aquí, nuestros datos muestran que el CasNa aumenta el número de células progenitoras mieloides en bazo y sangre periférica, aunque no se descarta la posibilidad que también pueda estar aumentando el número de LT-HSCs, lo cual se debería confirmar incluyendo un marcador como **Flk2 (Christensen & Weissman, 2001)** o realizando un trasplante de células de sangre periférica,

obtenidas de ratones tratados con CasNa, en ratones irradiados letalmente (**Challen et al., 2009**).

En la actualidad G-CSF es el movilizador convencional clínico sin embargo no es efectivo en todos los pacientes (**Holm, 1998; Pelus, 2008**), por lo que aun sigue vigente la necesidad de encontrar nuevos agentes movilizadores. En el presente trabajo mostramos que el CasNa es capaz de aumentar el número de células progenitoras en bazo y sangre periférica, en este ultimo tejido hay un aumento de 5 veces con respecto al vehículo, un dato semejante a lo que hace AMD3100 (**Pelus & Fukuda, 2008**), sin embargo para valorar su capacidad de movilización sería necesario comparar su efecto con respecto al G-CSF o AMD3100, así como el efecto combinado de CasNa + G-CSF, CasNa + AMD3100 o CasNa + G-CSF + AMD3100, con el fin de observar algún tipo de sinergia en la movilización. De tener un efecto similar al G-CSF o al AMD3100 ya sea por separado o en conjunto, el CasNa podría ser tomado en cuenta como una alternativa en aquellos pacientes que no responden al G-CSF.

Por otra parte, **Noursadeghi** en el 2002 mostró que ratones inyectados con dosis letales de bacterias sobrevivieron al recibir una inyección previa de caseína, lo cual se correlacionó con un incremento en la fagocitosis y estallido respiratorio de los granulocitos y un aumentado reclutamiento de neutrófilos en los tejidos, lo cual posiciona a la caseína como un inductor de la respuesta inmune innata. Nuestros datos también refuerzan el papel inmunomodulador de la caseína ya que el CasNa aumenta el número de progenitores del linaje monocito-macrófagos en médula ósea (**Figura 6A**) y también aumenta el número de progenitores de granulocitos y macrófagos tanto en bazo (**Figura 6B**) como en sangre periférica (**Figura 6C**), dos tipos de células fundamentales que participan en la respuesta inmune innata (**Burg et al., 2001; Basset et al., 2003**), así el CasNa parece potencializar la hematopoyesis medular y extramedular, lo cual ayuda a explicar la sobrevivencia de ratones a dosis letales de bacterias. En un futuro sería interesante confirmar este dato y así vislumbrar si puede emplearse como una medida profiláctica en individuos expuestos a algún riesgo de infección.

Aun desconocemos el mecanismo que utiliza el CasNa para regular la activación de la hematopoyesis medular, extramedular y el incremento de progenitores mieloides en torrente sanguíneo. Sin embargo se sabe que la inyección intraperitoneal de CasNa en ratones eleva la concentración de factores estimuladores de colonias (**Lotem & Sachs, 1985; Metcalf et al., 1996**); mientras que estudios preliminares de nuestro grupo de trabajo, bajo las mismas condiciones aquí reportadas, muestran que en ratones tratados con CasNa se ve aumentada la producción de G-CSF y GM-CSF en el suero, dos reconocidos movilizadores de HSPCs (**Pusic & DiPersio, 2008**). Lo anterior sugiere que estas citocinas podrían ser las responsables de la probable movilización inducida por el CasNa, sin embargo aun falta investigar la participación de otras citocinas movilizadoras tales como: SDF-1, Groβ, IL-8 o el SCF, tema que debe investigarse.

En el presente trabajo mostramos que el CasNa no es sólo una molécula pro-inflamatoria como se pensaba (**Baltz et al., 1980; Lotem & Sachs, 1985; Metcalf et al., 1996**) ya que también es capaz de activar la hematopoyesis medular y extramedular; además los datos mostrados aquí, sugieren que las HPCs se estarían movilizando desde médula ósea a torrente sanguíneo, incrementando su número en circulación, aunque no descartamos que quizás el CasNa estaría afectando directamente el bazo, activando la hematopoyesis extramedular, expandiendo las HPCs y por consiguiente aumentando su número en sangre periférica, lo cual explicaría, en este trabajo, que no hayamos encontrado alteraciones en la población de células progenitoras de médula ósea, por lo que en un futuro sería interesante demostrar el origen de las células progenitoras encontradas en torrente sanguíneo.

Finalmente, el CasNa, una molécula diferente a la familia de las citocinas, podría abrir una opción distinta para que en un futuro moléculas de menor costo, puedan ser empleadas en pacientes que no responden al G-CSF o para obtener progenitores mieloides hematopoyéticos de sangre periférica, que podrían utilizarse en trasplantes, para la recuperación hematopoyética de pacientes que han sido sometidos a radio o quimioterapia.

CONCLUSIÓN

La inyección de CasNa en ratón:

- Activa la hematopoyesis medular y extramedular.
- Aumenta el número de células progenitoras mieloides en bazo y sangre periférica.
- Las células progenitoras encontradas pertenecen al linaje de granulocitos, macrófagos y eritrocitos.
- El inmunofenotipo correspondiente es similar al de células progenitoras mieloides.

El CasNa es una molécula con propiedades de agente movilizador de al menos células progenitoras hematopoyéticas mieloides.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo mostramos que el CasNa aumenta en bazo y sangre periférica el número de HPCs lo cual sugiere un proceso de movilización de las HPCs desde médula ósea a sangre periférica sin embargo no se descarta que el CasNa podría afectar directamente el bazo resultando en la hematopoyesis extramedular y por consiguiente las HPCs estarían saliendo de bazo a torrente sanguíneo, sin embargo faltan algunos experimentos para corroborar lo anterior, por lo que en trabajos posteriores se recomendaría:

- .- Realizar una cinética del CasNa, para observar a que tiempo se alcanzan valores máximos de HPCs en circulación y además a que tiempo los valores regresan a la normalidad.
- .- Comparar el efecto movilizador del CasNa, G-CSF y AMD3100 en combinación o por separado para evaluar un posible efecto sinérgico.
- .- Evaluar por inmunofenotipo la presencia de células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo incluyendo el marcador flk2 a los marcadores KLS.
- .- Determinar los niveles de SDF-1, Groβ, SCF e IL-8 como posibles citocinas relacionadas con el efecto de movilización.
- .- Determinar la fuente de HPCs (médula ósea o bazo) que se encuentran en torrente sanguíneo.

BIBLIOGRAFÍA

Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-) Sca1(+) c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 2001; 15: 659-69.

Aguirre de Ávalos M, Quintana R, Brandan N. Citoquinas. Cátedra de Bioquímica. UNNE. 2002: pp 1-19.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000; 404: 193-197.

Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 2007; 26: 6724-6737.

Baltz ML, Gomer K, Davies AJ, Evans DJ, Klaus GG, Pepys MB. Differences in the acute phase responses of serum amyloid P-component (SAP) and C3 to injections of casein or bovine serum albumin in amyloid-susceptible and -resistant mouse strains. *Clin Exp Immunol*. 1980; 39: 355-360.

Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol*. 2004; 28: 509-554.

Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*. 2003; 21: S12-23.

Bellantuono I. Haemopoietic Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 607-620.

Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays*. 2007; 29: 166-177.

Broxmeyer HE, Srour E, Orschell C, Ingram DA, Cooper S, Plett PA, Mead LE and Yoder MC. Cord blood stem and progenitor cells. *Methods Enzymol.* 2006; 419: 439-473.

Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol.* 2001; 99: 7-17.

Challen GA, Boles N, Lin KK and Goodell MA. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A.* 2009; 75: 14-24.

Chessier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cell compartment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 105: 369-377.

Christensen JL and Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 14541-14546.

Davis W, Brown W, Wood P. Overview of the first International Symposium on Cytokines and Type I Type II Paradigm convened in Cairns, Australia, *Vet. Immunol and Immunopathol.* 1996; 63: 121-123.

Domínguez V. Efecto del CasNa en la hematopoyesis medular y extramedular de ratones BALB/c. Tesis de Maestría. FES Zaragoza, UNAM, 2007.

Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Seghal PA, Nathan DG, Clark SC. Stimulation of hematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature.* 1986; 321: 872-875.

Fenaux P, Chomienne C, Degos L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2001; 38: 13-25.

Fenaux P, Wang ZZ and Degis L. Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007; 313: 101-128.

Greenbaum AM, Link DC. Mechanisms of G-CSF-mediated hematopoietic stem and progenitor mobilization. *Leukemia*. 2010. (Epub ahead of print).

Hao QL, Zhu J, Price MA, Payne KJ, Barsky LW, Crooks GM. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood*. 2001; 97: 3683-3690.

Holmes C and Stanford WL. Concise Review: Stem Cell Antigen-1: Expression, Function, and Enigma. *Stem Cells*. 2007; 25: 1339-1347.

Holm M. Not all healthy donors mobilize hematopoietic progenitors cells sufficiently after G-CSF administration to allow for subsequent CD34 purification of the leukapheresis product. *J Hematother*. 1998; 7: 111-3.

Ihle JN and Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*. 1995; 11: 69-74.

Kessans MR, Gatesman ML, Kockler DR. Plerixaflor: a peripheral blood stem cell mobilizer. *Pharmacotherapy*. 2010; 30: 485-492.

Khaldoyanidi S, Sikora L, Broide DH, Rothenberg ME, Sriramarao P. Constitutive overexpression of IL-5 induces extramedullary hematopoiesis in the spleen. *Blood*. 2003; 101: 863-868.

Kiel MJ and Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2008; 8: 290-301.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997; 91:661-672.

Lagunes H. Estimulación de la hematopoyésis médular y extramedular inducida por el caseinato de sodio (CasNa) en ratones BALB/c. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. 2004.

Lapidot T, Kollet O. The brain-bone-blood triad: traffic lights for stem-cell homing and mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010; 2010: 1-6.

Lemoli RM, D' Addio A. Hematopoietic stem cell mobilization. *Haematologica*. 2008; 93: 321-324.

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

Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 938: 167-173.

Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 11872-11877.

Martinez C, Urbano A, Rozman M, Rovira M, Marin P, Montfort N, Carreras E and Monserrat E. Effects of short-term administration of G-CSF (filgrastim) on bone marrow progenitor cells: analysis of serial marrow samples from normal donors. *Bone marrow Transplant*. 1999; 23: 15-19.

Martinez N. Estudio de la proliferación in vivo de células hematopoyéticas de médula ósea en ratones inyectados con caseinato de sodio (CasNa). Tesis de Licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM. 2006.

Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res*. 2003; 34: 3-15.

Mayani H, Alvarado-Moreno JA and Flores-Guzman P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res*. 2003; 34: 476-488.

Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos J, Flores-Guzmán P, Chavez-Gonzalez A. Hematopoyesis. *Cancerología*. 2007; 2: 95-107.

Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*. 1997; 43: 119-128.

Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S, Di 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*. 1996 ; 88: 3755-3764.

Metcalf D. Cell-cell signalling in the regulation of blood cell formation and function. *Immunol Cell Biol*. 1998; 76: 441-447.

Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006; 107:1878-1887.

Na Nakorn T, Traver D, Weissman IL, Akashi K. Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *J Clin Invest*. 2002; 109: 1527-1528.

Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *J Cell Biochem*. 2006; 99: 690-705.

Noursadeghi M, Bickerstaff MCM, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys MB. Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J Immunol*. 2002; 169:913-919.

O'Malley DP, Kim YS, Perkins SL, Baldrige L, Juliar BE, Orazi A. Morphologic and immunohistochemical evaluation of splenic hematopoietic proliferations in neoplastic and benign disorders. *Mod Pathol*. 2005; 18: 1550-1561.

Passegué E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics. *Proc Nat Acad Sci*. 2003; 100: 11842-11849.

Pelus LM. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. *Curr Opin Hematol*. 2008; 15: 285-292.

Pelus LM and Fukuda S. Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia*. 2008; 22: 466-473.

Prosper F, Verfaillie CM. Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leukoc Biol*. 2001; 69: 307-316.

Pusic I and DiPersio JF. The use of growth factors in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Des*. 2008; 14: 1950-1961.

Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. Sodium caseinate induces the murine multipotent myeloid cell line 32D to express and secrete the macrophage colony stimulating factor (M-CSF). *Arch Med Res*. 2004; 35: 109-113.

Ramos-Mandujano G, Weiss-Steider B, Melo B, Córdova Y, Ledesma-Martínez E, Bustos S, Silvestre O, Aguiñiga I, Sosa N, Martínez I, Sánchez L and 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*. 2008; 213: 133-141.

Ray P, Krishnamoorthy N and Ray A. Emerging functions of c-kit and its ligand stem cell factor in dendritic cells. *Cell Cycle*. 2008; 7: 2826-2832.

Sachs L. The control of haematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 4742-4749

Silvestre EO. La inyección de CasNa en ratones BALB/c induce la proliferación y diferenciación de células de médula ósea del linaje mieloide y linfoide. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza, UNAM. 2007.

Stroncek DF, Dittmar K, Shawker T, Heatherman A and Leitman SF. Transient spleen enlargement in peripheral blood progenitor cell donors given G-CSF. *J Transl Med.* 2004; 2: 25.

Thomas TE, Miller CL, Eaves CJ. Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. *Methods.* 1999; 17: 202-218.

Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science.* 2000; 290: 2152-2154.

Walstra P and Jenneis R. *Dairy Chemistry and physics.* John Wiley Sons Ed, New York. 1984: pp 106-107.

Wang X, Hisha H, Taketani S, Adachi Y, Li Q, Cui W, Cui Y, Wang J, Song C, Mizokami T, Okazaki S, Li Q, Fan T, Fan H, Lian Z, Gershwin ME, Ikehara S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells.* 2006; 24: 482-493.

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000a; 100:157-168.

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science.* 2000b; 287: 1442-1446.

Wong CW, Watson DL. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J Dairy Res.* 1995; 62 : 359-368.

Yeung J and So CW. Identification and characterization of hematopoietic stem and progenitor cell populations in mouse bone marrow by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2009; 538: 301-315.

Yin T & Li L. The stem cells niches in bone. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1195-1201.