



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL CASEINATO DE SODIO (CASNA) EN LA
PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3 Y CÉLULAS DE MÉDULA
ÓSEA NORMAL DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Edelmiro Santiago Osorio
FES Zaragoza UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta
Facultad de Medicina UNAM
Dr. Alberto Monroy García
Facultad de Medicina UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL CASEINATO DE SODIO (CASNA) EN LA
PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3 Y CÉLULAS DE MÉDULA
ÓSEA NORMAL DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Edelmiro Santiago Osorio
FES Zaragoza UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta
Facultad de Medicina UNAM
Dr. Alberto Monroy García
Facultad de Medicina UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013



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 20 de mayo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **LEDESMA MARTÍNEZ EDGAR** con número de cuenta **93158471** con la tesis titulada **"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"** realizada bajo la dirección del **DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO:**

Presidente: DR. BENNY WEISS STEIDER
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de mayo de 2013.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por el apoyo brindado a lo largo de mi formación académica.

Al Programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo con número de registro 48959.

Al FONDO SEP-CONACyT 104025 por apoyar la presente investigación.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Al Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta

Al Dr. Alberto Monroy García

ÍNDICE

1. LISTA DE FIGURAS	1
2. LISTA DE ABREVIATURAS	3
3. RESUMEN	5
4. ABSTRACT	6
5. INTRODUCCIÓN	
a. HEMATOPOYESIS	7
b. REGULACIÓN HEMATOPOYÉTICA	11
c. LEUCEMIA	14
d. CLASIFICACIÓN	15
e. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO	19
f. TRATAMIENTO	20
g. CASEÍNA	22
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
7. HIPÓTESIS	27
8. OBJETIVO	28
9. MATERIALES Y MÉTODO	29
10. RESULTADOS	38
11. DISCUSIÓN	60
12. CONCLUSIÓN	66
13. PERSPECTIVAS	67
14. LITERATURA CITADA	68
15. ARTÍCULO REQUISITO	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la jerarquización hematopoyética.

Figura 2. Clasificación FAB de leucemias mieloides agudas (AML).

Figura 3. Clasificación OMS de leucemias mieloides agudas (AML).

Figura 4. Egresos hospitalarios por tumores malignos.

Figura 5. CasNa inhibe la proliferación pero no altera la viabilidad de células WEHI-3 a 72 h de cultivo.

Figura 6. Morfología de células WEHI-3 después de 72 h de cultivo

Figura 7. CasNa potencia la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal sin reducir la viabilidad a 120 h de cultivo.

Figura 8. Morfología de CMN después de 120 h de cultivo.

Figura 9. 0.5×10^3 células WEHI-3/mL iniciales son suficientes para obtener proliferación a 120 h con viabilidad igual al 90 %.

Figura 10. CasNa inhibe la proliferación y viabilidad de WEHI-3 a 120 h de cultivo, independientemente de la presencia de rmlL-3.

Figura 11. CasNa inhibe la proliferación de WEHI-3 pero potencia la de mononucleadas de médula ósea normal y del cocultivo de ambas manteniendo la actividad metabólica.

Figura 12. Cultivos de WEHI-3, mononucleadas de médula ósea normal y cocultivo de ambas con 5 ng/mL de rmlL-3 a 120 h de cultivo.

Figura 13. Diferenciación de WEHI-3, mononucleadas de médula ósea normal y cocultivo de ambas con 5 ng/mL de rmlL-3 a 120 h.

Figura 14. CasNa induce fragmentación en células WEHI-3 y cocultivo pero no en mononucleadas de médula ósea normal.

Figura 15. La inoculación i.p. de células WEHI-3 a ratones BALB/c, es letal independientemente del tamaño de inóculo.

Figura 16. La inoculación i.p. de células WEHI-3 a ratones BALB/c, incrementa los índices hepático, esplénico e induce la formación de tumores sólidos.

Figura 17. Las células leucémicas WEHI-3/GFP+ alcanzan la médula ósea, 24 h después de ser inoculadas i.p. a ratones BALB/c.

Figura 18. Células mononucleadas de médula ósea de ratones inoculados i.p. con células WEHI-3, proliferan *in vitro* en ausencia de rmlL-3.

Figura 19. Cultivos de CMN provenientes de médula ósea de ratones control o leucémicos, sin y con 5 ng/mL de rmlL-3 durante 96 h de cultivo.

Figura 20. El CasNa prolonga la supervivencia de ratones BALB/c leucémicos.

Figura 21. El CasNa reduce el tamaño del hígado y tumor de ratones leucémicos.

Figura 22. El CasNa reduce la hepatomegalia y el peso del tumor de ratones leucémicos.

Figura 23. Células mononucleadas de médula ósea de ratones inoculados i.p. con células WEHI-3, tratados o no con CasNa proliferan *in vitro* en ausencia de rmlL-3.

Figura 24. Cultivos de CMN provenientes de médula ósea de ratones control o leucémicos, sin y con tratamiento de CasNa en ausencia o presencia de 5 ng/mL de rmlL-3 durante 96 h de cultivo.

Figura 25. Células mononucleadas de médula ósea obtenidas de ratones BALB/c sin y con tratamiento de CasNa, son tan leucemogénicas como las células WEHI-3.

LISTA DE ABREVIATURAS

Agua DEPC	agua dietilpirocarbonatada
ALL	leucemia linfoide aguda
AML	leucemia mieloide aguda
ara-C	arabinosido de citosina/citarabina
Bas	granulocito basófilo
MO	médula ósea
CasNa	caseinato de sodio
CCL3/MIP-1a	ligando 3 de las CC quimiocinas
CD	cluster de diferenciación/antígenos de superficie celular
CFU	unidad formadora de colonias/progenitor
CFU-GEMM	progenitor de granulocito, eritrocito, megacariocitos y eritocitos
CFU-GM	progenitor granulocito/macrófago
CLP	progenitor linfoide común
CMN	células mononucleadas
CMN de MON	células mononucleadas de médula ósea normal
CMP	progenitor mieloide común
CR	remisión completa
DC	célula dendrítica
DGS	dirección general de salud
DNA	ácido desoxiribonucléico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Eo	granulocito eosinófilo
EPO	eritropoyetina
EST	esterasa
FAB	grupo Franco-Americano-Británico
FLT3	tirosina cinasa relacionada a fms
G-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos
GFP	proteína verde fluorescente
HSC	célula troncal hematopoyética
i.p.	intraperitonealmente
IFN-a	interferón alfa
IL-3	interleucina 3
IL-6	interleucina 6

IMDM	medio Dulbecco modificado por Iscove
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
Linfo	linfocito
MDS	síndrome mielodisplásico
MEP	progenitor megacariocito/eritroide común
MFC	citometría de flujo multicolor
MO	médula ósea
Mono	monocito
MPN	neoplasia mieloproliferativa
MPO	mieloperoxidasa
NK	célula NK
OMS	Organización Mundial de la Salud
Opti-MEM	medio esencial mínimo reducido en suero
PAS	ác. periódico de Schiff.
PB	sangre periférica
PBS	solución estabilizadora de fosfatos
PML	leucemia promielocítica aguda
PMN	granulocito polimorfonuclear
Pro-B	progenitor B
Pro-DC	progenitor dendrítico
Pro-NK	progenitor NK
Pro-T	progenitor T
RC	respuesta citogenética
SCF	factor de células troncales
SFB	suero fetal bovino
SSA	Secretaría de Salud
TGF-b	factor de crecimiento transformante beta
TNF-a	factor de necrosis tumoral alfa
uL	microlitro

RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (AML) es resultado de la transformación neoplásica de células troncales hematopoyéticas. En los últimos años los esquemas de tratamiento se han actualizado de acuerdo al avance del conocimiento de la biología celular, molecular y bioquímica de la leucemia, sin embargo, la mortalidad sigue siendo muy elevada, por lo que estrategias terapéuticas alternativas se siguen desarrollando. Desde hace algunos años se ha sugerido que el caseinato de sodio (CasNa) puede contener moléculas reguladoras de la hematopoyesis. En este trabajo mostramos que inhibe la proliferación en células leucémicas WEHI-3 e induce fragmentación del DNA, pero bajo condiciones idénticas promueve la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal sin evidencias de fragmentación del DNA ni reducción en la actividad metabólica. Considerando que la eliminación de células leucémicas pero no de las normales, es una estrategia terapéutica ideal, evaluamos el potencial antileucémico del CasNa *in vivo*. Se encontró que prolonga la supervivencia de ratones leucémicos y atenúa las manifestaciones de la enfermedad, lo que sugiere que bloquea el desarrollo de las células WEHI-3 *in vivo*. En conjunto, estos resultados apuntan que el CasNa tiene valor terapéutico potencial en el tratamiento contra la leucemia.

ABSTRACT

Acute myeloid leukaemia results from neoplastic transformation of haematopoietic stem cells. Though there have been recent advances in its treatment, mortality remains high. As a result, therapeutic alternatives continue to be explored. Here, we present evidence that casein, the principal protein in milk, could possess important antileukaemic properties. We demonstrate that casein inhibits the *in vitro* proliferation of the mouse myelomonocytic leukaemic cell line WEHI-3, and induces the cells into apoptosis. In contrast, under identical conditions, casein strongly promotes the proliferation of mouse normal mononuclear bone marrow cells. Because the selective elimination of leukaemia cells is an ideal therapeutic strategy, we also evaluated the antileukaemic potential of casein *in vivo*. We found that casein increases the survival of mice bearing WEHI-3-induced tumours, attenuating the manifestations of the disease such as hepatomegaly and growth of the solid tumour mass, suggesting that this molecule is also capable of inhibiting the proliferation of those cells *in vivo*. The fact that casein inhibits the proliferation and induces apoptosis of leukaemic cells *in vitro*, but increases survival *in vivo* in a leukaemic mouse model, indicate that it may be useful in leukaemia therapy.

INTRODUCCIÓN

Hematopoyesis.

Las células sanguíneas tienen como principal función el transporte de oxígeno y la defensa del organismo contra la invasión de agentes patógenos. Las células sanguíneas maduras (eritrocitos, granulocitos, monocitos, dendríticas, linfocitos y plaquetas) mueren por senescencia o bien durante el desarrollo de sus funciones normales (**Hughes-Jones & Wickramasingh, 1991**), siendo su número restituido por la formación de nuevas células sanguíneas mediante la hematopoyesis (**Orkin, 1995**). Es tradicionalmente aceptado que la hematopoyesis es un proceso jerárquico en el que células primitivas dan lugar a la formación de todos los constituyentes del sistema hematopoyético. Siguiendo este esquema, es posible distinguir de manera funcional cuatro compartimentos hematopoyéticos: troncal, progenitor, precursor y maduro (**Figura 1**).

El compartimento troncal corresponde al 0.01% del total de células en la médula ósea (MO), tiene capacidad de autorrenovación y da origen a todas las células sanguíneas durante la vida del individuo. Las células troncales humanas (HSC) derivadas de sangre periférica, MO o sangre de cordón umbilical, se caracterizan por reconstituir la hematopoyesis a largo plazo (**Fey, 2007**) en individuos mielosuprimidos, lo que funcionalmente les da la calidad de troncales. El compartimento progenitor constituye el 0.15% de las células de la MO y ha perdido la capacidad de autorrenovarse de manera que sustenta la generación de células sanguíneas solamente durante periodos limitados de tiempo. Estas células progenitoras al diversificarse, dan lugar a células precursoras reconocibles por su morfología las cuales corresponden a más del 99.5% de las células presentes en

la MO. Finalmente, el compartimiento maduro representa el último estadio de diferenciación de los elementos hematopoyéticos (**Montesinos & Mayani, 2001**) presentes mayoritariamente en torrente sanguíneo.

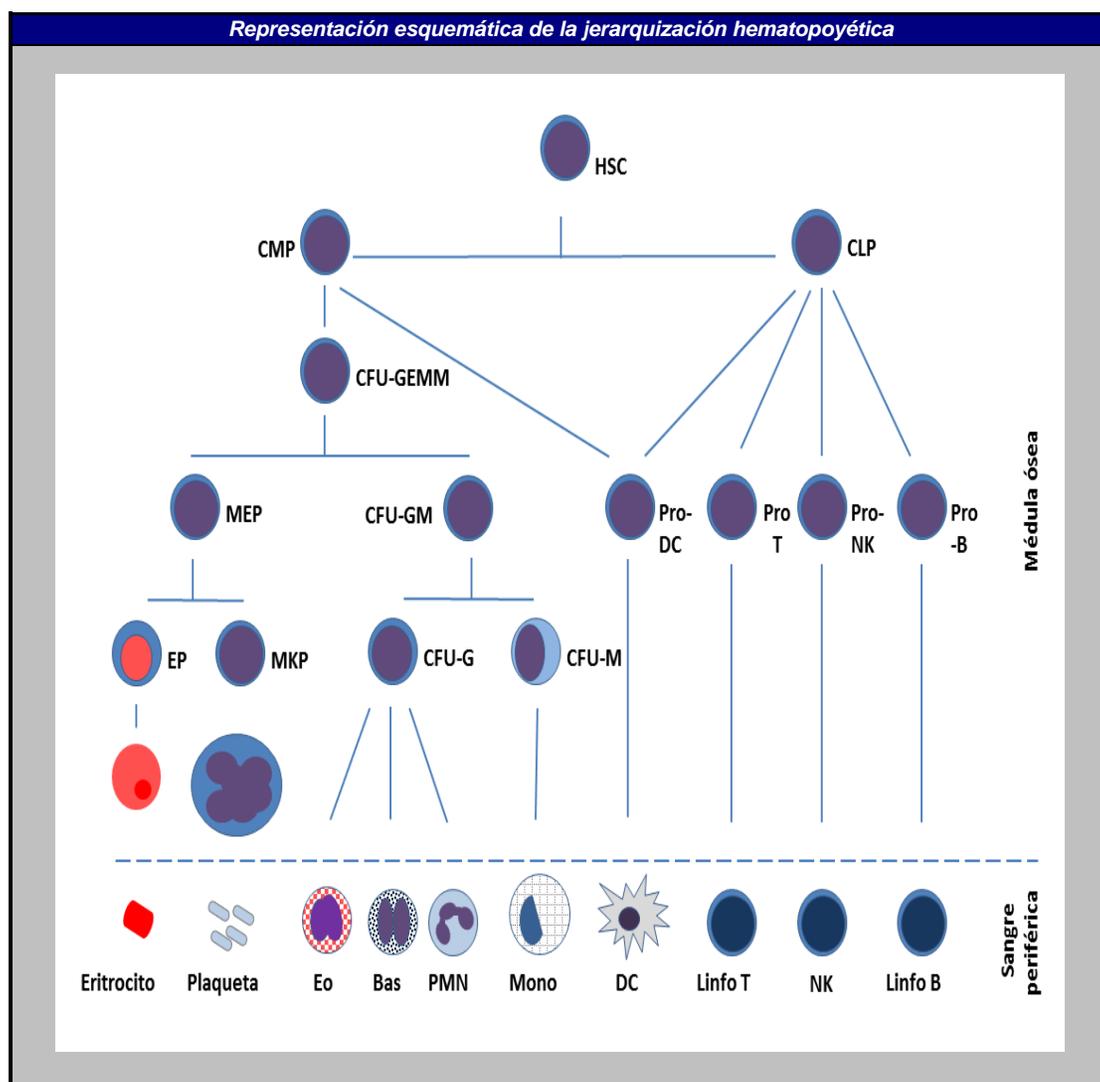


Figura 1. HSC (célula troncal hematopoyética), CLP (progenitor linfocítico común), CMP (progenitor mieloide común), CFU-GEMM (progenitor de granulocito, eritrocito, megacariocitos y eritrocitos), MEP (progenitor megacariocito/eritroide común), CFU-GM (progenitor granulocito/macrófago), Pro-DC (progenitor dendrítico), Pro-T (progenitor T), Pro-B (progenitor B), Pro-NK (progenitor NK), CFU (unidad formadora de colonias/progenitor), Eo (Granulocito eosinófilo), Bas (Granulocito basófilo), PMN (Granulocito polimorfonuclear), Mono (Monocito), DC (Célula dendrítica), Linfo (Linfocito), NK (Célula NK).

Tomado y modificado de Dingli & Pacheco, 2010.

El sistema hematopoyético representa un continuo de células con fenotipo y propiedades cambiantes a medida que progresan desde el estado troncal hasta el de células diferenciadas (**Coulombel, 2004**). El análisis sistemático funcional de las células hematopoyéticas muestra que expresan antígenos de superficie celular (CD) particulares. Al mismo tiempo, no expresan "marcadores de linaje" es decir, antígenos de superficie que son característicos de células hematopoyéticas diferenciadas de manera terminal. Por lo tanto, la eliminación de tales células positivas a linaje deja una suspensión de células predominantemente inmaduras. CD34 se descubrió originalmente como el resultado de una estrategia para desarrollar anticuerpos de reconocimiento de pequeños subconjuntos de células de médula humana, pero no células maduras de sangre y células linfoides. Posteriormente, se convirtió en la característica inmunofenotípica distintiva y base para la enumeración, aislamiento y manipulación de las HSC (**Bonnet, 2002**), en las cuales es expresado en cerca del 0.5-5% de las células de médula ósea. Este antígeno se ha podido identificar solo en las células troncales y progenitoras mas no en las células maduras (**Bellantuono, 2004; Civin et al., 1990**). La identificación de este antígeno ha servido de ayuda para poder separar las células troncales hematopoyéticas de los progenitores hematopoyéticas gracias en gran medida a la asociación de otro antígeno denominado CD38 quedando finalmente la nomenclatura para las HSC de humanos el fenotipo CD34⁺CD38⁻ (**Glimm et al., 2001; Bhatia et al., 1997**).

Ontológicamente las HSC dan lugar a precursores mieloides comunes con marcadores adicionales al CD34⁺. Así, las CFU-GEMM CD33⁺ (unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos) generan progenitores de los diferentes linajes mieloides volviéndose cada vez más

especializados en sus funciones. Para el linaje eritroide, las unidades formadoras de bursa eritroide (BFU-E) son los primeros progenitores comprometidos exclusivamente a la diferenciación eritroide, y dan lugar a múltiples agrupados de colonias de células productoras de hemoglobina. Posteriormente, una segunda clase más diferenciada de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E) dará lugar a precursores eritroides. Conforme las células progenitoras mieloides se restringen al linaje de monocitos y granulocitos, adquieren marcadores característicos tales como la mieloperoxidasa o CD38 que se expresa en mieloblastos, pero pierden marcadores iniciales tales como CD33 que no está presente más allá de la etapa de mielocitos. Una serie de marcadores "tardíos" como CD11b o fosfatasa alcalina leucocitaria, todavía están presentes en los granulocitos maduros.

La ontogenia de los monocitos sigue los mismos principios de la diferenciación granulocítica; sin embargo, marcadores únicos de superficie celular que indiquen diferenciación monocítica han sido difíciles de identificar. Por ejemplo, CD11b está presente en células de la línea monocítica, y CD14, parte del receptor para el lipopolisacárido (LPS), es de importancia funcional en los monocitos, pero no son específicos de linaje. Posteriormente la expresión diferencial de CD14 y CD16 distingue dos subconjuntos: $CD14^{hi} CD16^{-}$, a menudo llamados monocitos clásicos y $CD14^{+} CD16^{+}$ que expresan mayores cantidades de moléculas MHC de clase II que se ha sugerido, se asemejan a macrófagos de tejidos maduros (**Passlick et al., 1989; Ziegler-Heitbrock et al., 1993**). De manera interesante, los monocitos pueden servir a su vez como precursores de células dendríticas (DC).

Por su parte, las células progenitoras comprometidas con el linaje de megacariocitos se diferencian en promegacarioblastos, que a su vez forman

megacariocitos maduros. Estas últimas células, muy visibles en frotis de médula ósea no pueden someterse a la división celular, pero conservan la capacidad para la síntesis de DNA y así convertirse en poliploides. Las plaquetas se desprenden de los megacariocitos como "ampollas" formadas de su citoplasma.

Las células B son el subconjunto de linfocitos especializados para sintetizar y liberar inmunoglobulinas (Ig). Se generan en la médula ósea, a partir de las células progenitoras linfoides comunes (CLP) $CD34^+$, pero de linaje negativo (Lin^-), lo que implica que carecen de expresión de marcadores presentes en células mieloides y linfoides maduras. Posteriormente los primeros precursores linfoides expresan $CD34$ y $CD10$, que en células pro-B se complementa con los marcadores $CD19$ y $CD20$ de células B.

En el caso de células T, el CLP en la médula ósea envía su progenie destinada a formar células T al timo, aquí los progenitores linfoides expresan $CD25$, el receptor de IL-2, lo cual es crítico en el desarrollo y comprometimiento final de diferenciación. A lo largo de la línea de diferenciación de células T, las células pre-T deben someterse al compromiso de convertirse en células $CD4^+$ helper o en células $CD8^+$ T citotóxicas (**Fey, 2007**).

Regulación hematopoyética.

La regulación de las células troncales hematopoyéticas es gobernada por dos entidades íntimamente relacionadas. Una es la expresión de genes y la otra es la composición de señales externas del microambiente de la médula ósea. Los factores de transcripción que regulan la expresión de genes, junto con señales externas provenientes del microambiente de la médula ósea pueden ser mediadas, ya sea por interacciones célula- célula, matriz extracelular-célula y por

factores solubles llamados factores de crecimiento o citocinas (**Arai et al., 2009**). Las diferentes interacciones junto a estos factores dan como resultado la promoción o inhibición de la proliferación, así como la diferenciación, la migración y la apoptosis. Las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente heterogéneo conocido como microambiente, constituido por células hematopoyéticas, células estromales, sus productos biosintéticos y factores proteicos conocidos como citocinas hematopoyéticas (**Clark & Keating., 1995**). Las células que constituyen este microambiente son: fibroblastos, precursores osteogénicos, adipocitos, macrófagos y células endoteliales, que en conjunto producen una compleja trama de moléculas de matriz extracelular y citocinas. Las primeras consisten de: proteoglicanos, heparán, condroitina, dermatán, colágeno, fibronectina, hemonectina, trombospondina, laminina y ácido hialurónico (**Klein, 1995; Verfaillie et al., 1994**) siendo su principal función la de proveer el microambiente propicio para favorecer la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Por su parte las citocinas, el segundo tipo de proteínas dentro del microambiente hematopoyético; regulan la fisiología de las células hematopoyéticas y sus precursores (**Giles et al., 2002; Munker et al., 1998**) a través de receptores específicos, los cuales transmiten una serie de señales intracelulares que dan la información necesaria para sobrevivir o morir, proliferar o diferenciarse, o en el caso de las células troncales autorenovarse o permanecer quiescentes (**Broxmeyer et al., 2001**).

Siendo la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas dependiente de la continua fuente de citocinas, algunas de ellas, actúan en diversos linajes y en distintas etapas de maduración, pudiendo estimular el crecimiento de una sola línea hematopoyética (eritropoyetina EPO, factor

estimulador de colonias de granulocitos G-CSF), el crecimiento de varios linajes tanto mieloides como eritroides (interleucina 3 IL-3) o incluso, actuar a nivel de progenitores muy inmaduros (factor de células troncales SCF), o tener acciones pleiotrópicas (interleucina 6 IL-6) (**Clark & Kamen, 1987**).

Dentro de la familia de las citocinas se incluye a los factores estimuladores de colonias (CSF). Originalmente descritos en la década de 1960 y principios de 1970 como glicoproteínas que inducían el crecimiento clonal de diferentes linajes hematopoyéticos de la médula ósea (**Metcalf, 2008**). Una variedad de estos factores fueron nombrados por sus funciones utilitarias: M-CSF estimula los macrófagos, G-CSF estimula granulocitos, GM-CSF estimulan ambos granulocitos y macrófagos, mientras que multi-CSF ahora conocido como IL-3, induce el crecimiento de todos los diferentes tipos de células hematopoyéticas (**Douglass et al., 2008**). Por el contrario, las citocinas conocidas como co-estimuladoras muestran un efecto directo pequeño o nulo en formación de colonias, pero tienen la capacidad de actuar de manera sinérgica con los CSF. Ejemplos de esto lo constituyen el SCF o ligando c-kit y la tirosina cinasa FLT3. SCF es un factor de transcripción, que reacciona con el receptor c-kit presente en células CD34⁺ CD38⁻ de médula ósea, acelera su entrada en el ciclo celular y en cooperación con BCL-2 impide apoptosis, además influye en la diferenciación a todos linajes hematopoyéticos y puede colaborar con casi todas las citocinas hematopoyéticas conocidas para promover la formación de colonias (**Fey, 2007**).

Respecto a las citocinas supresoras, entendido esto como la capacidad para regular negativamente la síntesis de DNA, proliferación, viabilidad y diferenciación celular, pueden mencionarse el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón

alfa (IFN- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el ligando 3 de las CC quimiocinas (CCL3/MIP-1 α) (**Jacobsen et al., 1994; Hamblin, 1993**).

La desregulación de la producción de las células sanguíneas puede desembocar en un proceso neoplásico maligno que genéricamente es conocido como leucemia.

Leucemia.

La leucemia es un tipo de cáncer de la sangre iniciado por la mutación de una célula hematopoyética del compartimento troncal. La progenie clonal de esta célula mutada, constituye una población heterogénea en la cual la proliferación y diferenciación desregulada, inducen una acumulación de células blásticas no funcionales (**Stone et al., 2004**). Como en otros tipos de cáncer, la ontogenia de la leucemia es un proceso multipaso de alteraciones genéticas mediante las cuales, las células normales adquieren una sucesión de capacidades distintivas, como son: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de la proliferación, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis, que en última instancia les permiten convertirse en tumorigénicas y malignas (**Hanahan & Weinberg, 2000**).

Debido a que la regulación intrínseca de la hematopoyesis corre a cargo de factores de transcripción hematopoyéticos, alteraciones genéticas como las translocaciones cromosómicas en las leucemias agudas afectan la expresión y funcionamiento de diversos factores de transcripción, perturbando los programas de diferenciación e inducción de apoptosis. Por ejemplo, en células de leucemia

linfoblástica T aguda (ALL), la expresión inapropiada de SCF debido a translocaciones cromosómicas contribuye a la leucemogénesis. La expresión aberrante de FLT3 (a menudo causada por duplicaciones internas en tándem del gen) es una de las anomalías genéticas más comunes en la AML y se asocia con un curso clínico agresivo. La localización de anomalías citogenéticas en el brazo largo del cromosoma 5, donde se encuentran varios factores de crecimiento (IL-3, GM-CSF, etc.), son de especial interés y se ha sugerido que la delección de esta región podría ser importante en estas enfermedades clonales (**Sans-Sabrafen & Besses, 2006**). La desregulación de los genes Hox (por genes de fusión o sobreexpresión del gen silvestre) sustentan la inmortalización de las células leucémicas en AML y ALL (**Alharbi et al., 2012**). Mutaciones moleculares en C/EBP, una proteína potenciadora de unión a CCAAT alfa (C/EBP alfa), que junto con FLT3 es esencial para el desarrollo normal de granulocitos, es un importante factor pronóstico de relevancia clínica en AML, especialmente en pacientes con un cariotipo normal (**Fey, 2007**).

Clasificación.

A partir de la década de los setenta, la leucemia aguda y los síndromes mielodisplásicos (MDS) se han definido y clasificado de acuerdo con las recomendaciones del grupo Franco-Americano-Británico (FAB) (**Figura 2**). Actualmente, estas clasificaciones están siendo sustituidas por las de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicadas en 2001 (**Figura 3**), las cuales son mucho más amplias en sus objetivos e incluyen trastornos mieloproliferativos y linfoproliferativos crónicos (**Vardiman et al., 2002**). La aplicación de los criterios de la OMS requiere conocer los resultados de los

análisis de inmunofenotipificación y citogenéticos, lo que en conjunto con las características morfológicas, se utilizan para establecer el linaje y estado de maduración de las células neoplásicas. Al mismo tiempo, el porcentaje de blastos permite de manera práctica, categorizar el tipo de neoplasia mieloide y predecir su progresión. En este sentido, una neoplasia mieloide se considera como leucemia mieloide aguda (AML) cuando 20 % o más de blastos aparecen en PB o MO, pudiendo ser un padecimiento *de novo* o por el contrario, evolucionar de MDS, neoplasia mieloproliferativa o mielodisplásica (MDS/MPN) previamente diagnosticada. En algunos casos, el diagnóstico de AML puede prescindir del recuento de blastos en PB o MO, por ejemplo cuando está asociado con anomalías genéticas específicas, y el umbral de blastos de 20% puede no ser un mandato para tratar al paciente como AML; de esta manera las decisiones terapéuticas se basan en la situación clínica después de analizar toda la información disponible (**Vardiman, 2009**). La leucemia representa el 3.4% de la causa de muerte en hombres y mujeres a nivel mundial (**Jemal et al., 2010**). En México de acuerdo a la Secretaría de Salud (SSA) y las estadísticas del INEGI en 2008 se reporta que del egreso hospitalario por tumores malignos, la leucemia tuvo la segunda más alta presencia (8.7%), sólo por debajo de los tumores malignos pulmonares y afectando al 15.1% de hombres y al 5.6 % de las mujeres (**Figura 4**).

Clasificación FAB de leucemias mieloides agudas (AML)				
Morfología	Histoquímica	Inmunofenotipo	Citogenética	
M0 Indiferenciada >90% blástos	MPO ⁺ 3% PAS y EST ⁻	HLA-DR ⁺ , CD13 ⁺ , CD33 ⁺ , CD34 ⁺ ; CD7 ^{+/-} , TdT ^{+/-}	11q13; cambios complejos en 5 o 7; t(p,22) ocasionalmente	
M1 Mieloide / Mieloblástica sin maduración >90% blástos, 10% de granulocitos o monocitos en maduración	MPO ⁺ 3% PAS ⁻ EST ⁻	HLA-DR ⁺ , CD13 ⁺ , CD33 ⁺ , CD34 ⁺ ; CD7 ^{+/-} ; CD15 ^{+/-} ; TdT ^{+/-}	-5, -7, -17, del 3p, +21, +8	
M2 Mieloide / Mieloblástica con diferenciación 30-90% de blástos, >10% de granulocitos, <20% de monocitos	MPO ⁺ 10% PAS ⁻ EST ⁻	HLA-DR ⁺ , CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD33 ⁺ , CD34 ^{+/-}	t(8,21); del 3p o inv(3); - 5, -7, t(6,9), +8	
M3 Promielocítica Promielocitos anormales con granulación densa/bastones de Auer	MPO ⁺ PAS ⁻ EST ⁻	HLA-DR ⁻ , CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD33 ⁺ , CD34 ^{+/-}	t(15,17)	
M4 Mielomonocítica >30% de blástos, >20% pero <80% de monocitos	MPO ⁺ EST ⁺ PAS ⁻	HLA-DR ⁻ , CD14 ⁺ , CD15 ^{+/-} ; CD4 ^{débil+} ; CD34 ^{+/-} ; CD33 ⁺ ; CD13 ⁺ ; CD11b ⁺	Inv(16) o -16q; t(8,21) poco frecuente, -5, -7, +8	
M5 Monocítica / Monoblástica >80% de monoblastos, <20% de granulocitos	MPO ⁻ PAS ⁺ EST ⁺		t(9;11) (p21;p23), +8	
M6 Eritroleucemia >50% de células eritrocíticas, 30% de blástos no eritroides granulares o agranulares	PAS ⁺⁺ MPO ⁻ EST ⁻	HLA-DR ^{+/-} ; CD13 ^{+/-} ; CD33 ^{+/-} ; glicoforina A ⁺⁺	-7 o del (7q) y/o del -3, +8	
M7 Megacarioblástica >30% de megacarioblastos	PAS ^{+/-} MPO ⁻ EST ⁻	HLA-DR ⁺ ; CD34 ⁺ ; CD33 ^{+/-} ; CD41 ⁺ , CD61 ⁺ glicoforina plaquetaria ⁺	T(12;21) en 20-25%; hiperplodia; +8, +21	

MPO: mieloperoxidasa; PAS: ác. Periódico de Schiff. EST: esterasa.
TdT, HLA-DR, CD34: antígenos de células precursoras. CD13, Cd33, CD15: antígenos de células mieloides. CD11 y
CD14: antígenos de células monocíticas.

Figura 2. Tomado y modificado de Beveridge & Urtasun, 2003.

Clasificación OMS de leucemias mieloides agudas (AML)	
Leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas recurrentes	AML con t(8,21)(q22;q22),(AML1/ETO) AML con eosinófilos anormales de médula ósea e inv(16)(p13q22) o t(16:16)(p13;q22), (CBFb/MYH11) APL con t(15;17)(q22;q12),(PML/RARa) AML con anomalías en 11q23 (MLL)
Leucemia mieloide aguda con displasia multilineaje	Secundaria a MDS o MDS/MPD Sin antecedentes de MDS o MDS/MPD pero con displasia en al menos 50% de células en 2 o más linajes mieloides
Leucemia mieloide aguda y síndromes mielodisplásicos relacionados a terapia	Del tipo relacionado con radiación/agentes alquilantes Del tipo relacionado con inhibidores de la topoisomerasa II
Leucemia mieloide aguda	AML, mínimamente diferenciada AML sin diferenciación AML con diferenciación Leucemia mielomonocítica Leucemia mieloblastica/monocítica Leucemia eritroide aguda (eritroide/mieloide y eritroleucemia pura) Leucemia megacarioblastica aguda Leucemia basofílica aguda Panmielosis con mielofibrosis Sarcoma mieloide

Figura 3. Tomado y modificado de Vardiman, 2009.

Egresos hospitalarios por tumores malignos			
Tipo de Tumor Maligno	Total	Hombres	Mujeres
Total	100	100	100
Leucemias	8.7	15.2	5.6
Mama	5.8	0.4	8.3
Cuello del Útero	3.3	0.0	4.8
Ovario	2.1	0.0	3.1
Tráquea, bronquios y pulmón	20.0	4.1	1.0
Próstata	1.9	6.0	0.0
Estomago	1.8	3.1	1.1
Colon	1.8	3.2	1.2
Hígado	1.2	1.9	0.8
Recto igmoides, recto y ano	1.1	2.0	0.7
Vejiga	1.0	2.2	0.4
Labio, cavidad bucal y faringe	0.9	1.9	0.5
Páncreas	0.9	1.5	0.7
Cuerpo del Útero	0.8	0.0	1.1
Melanoma y otros tumores de la piel	0.5	0.6	0.3
Esófago	0.4	1.1	0.1
Otros	65.8	56.8	70.3

Figura 4. Tomado y modificado de SSA DGS (2008) Egresos hospitalarios 2008 Proceso INEGI

Características clínicas y diagnóstico.

Del 15% a 20% de los pacientes son menores de 15 años, la media de diagnóstico es de entre 65 y 75 años, de manera que su incidencia aumenta con la edad. En este sentido, la AML es el tipo de leucemia más común en los adultos, representando el 25% de todas las leucemias en el mundo occidental (**Robak & Wierzbowska, 2009**) y no parece existir diferencia en la incidencia entre hombres y mujeres (**Smith et al., 1999**). En México de acuerdo a la Secretaría de Salud (SSA) y las estadísticas del INEGI en 2008 se reporta que del egreso hospitalario por cáncer, la leucemia representa el 8.7%, afectando principalmente a los hombres 15.1%, mientras que las mujeres un 5.6%

Clínicamente los síntomas y signos que presentan los pacientes con leucemia son variados, entre ellos son comunes, la insuficiencia medular evidenciada por leucopenia, invasión de células blásticas a órganos extramedulares, coagulopatías, leucocitosis, leucostasis, trastornos metabólicos relacionados con la proliferación, entre otros; siendo la manifestación cutánea más frecuente y específica, la aparición de uno o de varios tumores sólidos a menudo descritos como sarcomas granulocíticos (**Gimenez, 1986**).

El 75% a 100% de los pacientes cursan con astenia y debilidad generalizada debida a la anemia; son frecuentes las manifestaciones hemorrágicas leves, como epistaxis o petequias (50% a 60%). La presencia de fiebre se da en el 40% a 60% de pacientes, pero la documentación microbiológica de infección se da en menos del 50% de éstos. Entre las alteraciones analíticas, la anemia y la trombocitopenia son prácticamente constantes, con hemoglobinas medias menores de 10 g/dl y cifras de plaquetas medias menores de $1 \times 10^5 / \mu\text{L}$; la presencia de leucopenia es

más rara, con cifras medias de neutrófilos menores de 500/uL en sólo el 10% de pacientes (**Beveridge & Urtasun, 2003**).

En pacientes con síntomas de anemia, siempre que el sangrado sea importante, se descarta leucemia promielocítica aguda (PML), especialmente si el conteo de leucocitos es $>1 \times 10^4$ células/uL o de $>1 \times 10^3$ blastos/uL en PB. Por el contrario, cuentas superiores a 1×10^3 - 2×10^3 blastos/uL de PB, pueden ser suficientes para fines de diagnóstico y estratificación de AML no-PML. El diagnóstico de PML se confirma mediante la demostración del reordenamiento PML-RARalfa y la translocación 15:17 resultante; esto se analiza normalmente utilizando hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Por su parte, la citometría de flujo multicolor (MFC) ha sustituido paulatinamente a la tinción histoquímica como herramienta para establecer el linaje de las células blásticas, siendo los antígenos de linaje mielóide más empleados CD33, CD13, CD117 (CKIT), CD14, CD41 CD64 y glicoforina A (**Estey & Döhner, 2006**)

Tratamiento.

El tratamiento para la AML incluye tres fases, al menos un curso de quimioterapia de inducción intensiva, seguido por un curso adicional de terapia de consolidación y uno de mantenimiento. El objetivo de la quimioterapia consiste en erradicar las células neoplásicas dentro de la MO para permitir la repoblación con precursores hematopoyéticos normales, sin embargo, debido a que los fármacos usados no son específicos para las células leucémicas, durante el tratamiento también mueren las células normales. La mayor parte de los fármacos utilizados son: antimetabolitos, agentes alquilantes y antibióticos. El objetivo del tratamiento de

inducción a la remisión es erradicar el 99% de la masa leucémica inicial, restaurar la hematopoyesis normal y alcanzar un estado funcional normal.

La terapia moderna de inducción en la AML comenzó en la década de 1960, cuando moléculas como el arabinosido de citosina (citarabina, ara-C) y las antraciclina, mostraron una importante actividad como agentes únicos (**Rowe, 2007**), desde entonces y hasta la actualidad, la ara-C es la piedra angular de la terapia de inducción y de consolidación para la AML en pacientes menores de 60 años, no obstante, otros medicamentos incluidos en los esquemas de inducción a la remisión son: glucocorticoides (prednisona o dexametasona), vincristina, antraciclina, L-asparginasa y la adición de ciclofosfamida en pacientes de alto riesgo como parte de una terapia intensiva.

Una forma estándar de la terapia de inducción consiste en ara-C (100-200 mg/m²), administrada por una infusión continua durante 7 días, en combinación con una antraciclina, administrado por vía intravenosa durante 3 días. Por su parte, la terapia de consolidación comprende el tratamiento con ciclos adicionales de quimioterapia intensiva después de que el paciente ha logrado una remisión completa (CR), por lo general con dosis más altas de los mismos medicamentos (2-3 g/m² de ara-C) que se utilizaron durante el período de inducción.

La terapéutica de inducción clásica de la AML con una antraciclina (habitualmente idaurubicina) junto a la ara-C, presenta una actividad escasa en las leucemias secundarias, alcanzándose la respuesta citogenética (RC) sólo en el 50% de los pacientes y habitualmente de corta duración (media de <5 meses). Este tratamiento sólo se considera estándar en aquellos casos con alteraciones genéticas favorables, e incluso en estos casos los resultados son peores que en las leucemias primarias (**Díaz-Beveridge & Aparicio, 2003**).

En los últimos años nuevos medicamentos se han evaluado en estudios clínicos, incluyendo inmunotoxinas, anticuerpos monoclonales, análogos de los nucleósidos, agentes hipometilantes, inhibidores de la farnesiltransferasa, agentes alquilantes, inhibidores de la tirosina quinasa 3 y moduladores multi-resistentes (**Tallman et al., 2005**); sin embargo, a pesar del progreso sustancial en el tratamiento, del 20% a 40% de los pacientes recién diagnosticados con AML no logran la remisión y 50% a 70% de aquellos en primera CR se espera que recaigan dentro de los 3 años siguientes. Además existen pacientes que no son candidatos a las estrategias convencionales (**Robak & Wierzbowska, 2009**), no pueden acceder al tratamiento en términos económicos (**Ruiz-Argüelles et al., 2007**), o han dejado de ser responsivos a la terapia. Todo esto se traduce a que la AML, tiene la tasa de supervivencia más baja de todas las leucemias (**Deschler & Lübbert, 2006**) y la mayoría de los pacientes mueren de su enfermedad (**Stone, 2004**).

Caseína.

La leche y los productos lácteos son componentes importantes de la dieta humana aún en la etapa adulta e históricamente se les ha valorado por su aporte nutricional de aminoácidos (**Koletzko et al., 1998**). La leche está constituida por 3.6% de proteínas, 4.1% de grasas, 5.0% de carbohidratos, menos del 1% de vitaminas y minerales y 86.6% de agua. El 80% de la fracción proteica la constituye la caseína (**Walstra & Jenners, 1984**), la que está compuesta por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas por: alfa-S1 caseína, alfa-S2 caseína, beta-caseína y kappa-caseína (**Warner, 1976; Hall, 1971**).

Si bien las citocinas son los principales reguladores de la hematopoyesis, existen evidencias de que estas glicoproteínas no son las únicas que pueden influir en la generación de las células sanguíneas, así existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta a las citocinas que pueden tener efectos similares sobre las células hematopoyéticas. En este sentido, diferentes estudios han sugerido que las proteínas de la leche pueden estar involucradas en procesos hematopoyéticos más allá del aporte de aminoácidos. En efecto, la eliminación de caseína en la dieta de ratas y ratones provoca mielosupresión (**Stanović & Boranić, 1996**) y una dieta privada de proteínas pero suplementada con caseína, favorece la hematopoyesis (**Aschkenasy, 1971**). Es conocido que su eliminación de la dieta en ratones induce una producción deficiente de eritrocitos a consecuencia de la reducción en la producción de eritropoyetina (**Okano et al., 1992**).

Por otro lado, la inyección intraperitoneal de CasNa además de inducir quimiotaxis de granulocitos y monocitos (**Pasotti et al., 1993**), lo cual se ha empleado con éxito para estudiar la inflamación de manera controlada, también induce acumulación de actividad estimuladora de colonias en suero y exudado de la cavidad peritoneal (**Metcalf et al., 1996; Lotem & Sachs, 1983**). La inyección subcutánea de caseína permite la sobrevivencia de ratones inyectados con dosis letales de bacterias, actividad que se debe a la elevación de los niveles del G-CSF el cual activa a los granulocito-neutrófilos para eliminar a las bacterias (**Noursadeghi et al., 2002**), acelerando la diferenciación de neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares en ratón (**Santiago-Osorio et al., 2010**). Así mismo, el CasNa induce activación de la hematopoyesis al incrementar el número de células mononucleadas de médula ósea *in vivo* (**Donahue et al., 1986**), e inducir un

aumento de los precursores de origen mieloide en la médula ósea de ratón (**Liebermann & Hoffman-Liebermann, 1989**),

Por otro lado, se ha sugerido que la caseína, o algunos de sus componentes, producto de su digestión enzimática, pueden ser biomoléculas reguladoras de la hematopoyesis más allá del aporte de aminoácidos (**Okano et al., 1992; Cross & Gill, 2000**). A este respecto se ha encontrado que las subunidades alfa, beta y kappa-caseína, constituyentes de la caseína, contienen un número importante de péptidos bioactivos, para los que existen receptores en las células mieloides, tanto normales como de origen leucémico (**Read et al., 1990; Jinsmaa & Yoshikawa, 1999**). Asimismo se han dado evidencias de la presencia de receptores para caseína y CasNa, una sal de caseína, en granulocitos y monocitos (**Lewis & Van Epps, 1983; Hira et al., 2003**). Adicionalmente, se ha mostrado que la beta-caseína activa la producción de radicales libres en granulocitos e induce la proliferación de linfocitos de carnero (**Wong et al., 1996**) y de linfocitos T de pacientes con diabetes tipo 1 y 2 (**Cavallo et al., 1996**), mientras que péptidos derivados de caseína pueden estimular o disminuir la actividad de linfocitos (**Kayser & Meisel, 1996; Pessi et al., 2001**).

Todos estos elementos muestran que moléculas y péptidos de caseína pueden incidir en la regulación de la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas normales, así como también en aquellas de origen leucémico; teniendo por tanto aplicación terapéutica potencial. En este sentido, recientemente se reportó que el CasNa es capaz de bloquear la proliferación de las células leucémicas WEHI-3, J774 y P388 *in vitro*. Inhibe la proliferación de una línea celular hematopoyética normal dependiente de IL-3 e induce su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago (**Ramos et al., 2008**), además acelera la

diferenciación de neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares (**Santiago-Osorio et al., 2010; Ramos et al., 2004**). De manera interesante, el efecto biológico del CasNa sobre células hematopoyéticas, es mayor al ejercido por las subunidades de caseína de manera individual en el mismo tipo de células (**Ramos et al., 2008**). Por otro lado, en cultivo primario de células de médula ósea, el CasNa sinergiza la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal (CMN de MON) de ratón en presencia de interleucina 3 recombinante de ratón (rmlL-3) como factor de crecimiento (**Ledesma-Martínez et al., 2012**), mientras que al ser administrado intraperitonealmente a un ratón BALB/c sano, además de incrementar el índice esplénico, aumenta también el tamaño de los centros germinales (**Lagunez, 2004**) y recientemente se publicó que se promueve la granulopoyesis (**Domínguez et al., 2012**).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años nuestro grupo de trabajo ha mostrado que el CasNa inhibe la proliferación, induciendo o no la diferenciación, de líneas celulares hematopoyéticas normales y leucémicas de ratón. Por otro lado, hemos mostrado que coadyuva con la interleucina-3 en la inducción a la proliferación y diferenciación de células normales hematopoyéticas de ratón. Sin embargo, desconocemos si en un cocultivo de células normales y células leucémicas, el CasNa mantiene su capacidad de inducir la proliferación de células hematopoyéticas normales al mismo tiempo que inhibe la de células leucémicas. Por otro lado, hemos mostrado que la inyección de CasNa promueve la granulopoyesis en médula ósea de ratón, lo cual sugiere que al igual que *in vitro*, estimula la hematopoyesis *in vivo*, no obstante desconocemos si tiene la capacidad para bloquear el desarrollo de leucemia *in vivo*.

HIPÓTESIS

Se ha mostrado que el CasNa frena la proliferación de líneas celulares normales y leucémicas de ratón, mientras que potencia la proliferación y diferenciación de células normales de médula ósea *in vitro* e *in vivo*. Por lo anterior, se espera que en el cocultivo de células leucémicas y normales de médula ósea, así como en ratones inyectados con células leucémicas WEHI-3, el CasNa bloquee la proliferación de células leucémica en tanto que estimulará la de células hematopoyéticas normales.

OBJETIVO

- Establecer el cocultivo de células leucémicas WEHI-3 y células normales de médula ósea de ratón BALB/c.
- Evaluar el efecto del caseinato de sodio en la proliferación y viabilidad de cocultivos de células leucémicas WEHI-3 y normales de médula ósea de ratón BALB/c.
- Establecer el modelo de leucemia en ratones BALB/c empleando células WEHI-3.
- Analizar el efecto del caseinato de sodio inyectado intraperitonealmente en la sobrevivencia de ratones BALB/c leucémicos.

MATERIALES Y MÉTODO

Línea WEHI-3 de ratón. Para este trabajo se empleó la línea de leucemia mielomonocítica WEHI-3 de ratón. Las células fueron cultivadas 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 1.1 μM de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo), a una densidad de 3×10^4 células/mL, 37°C y 5% de CO_2 con cambio de medio cada 48 h.

Animales. Los procedimientos que involucraron animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ratones hembra BALB/c en condiciones libres de patógenos y alimentados con una dieta estándar de laboratorio, fueron alojados en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.

Obtención de células mononucleadas de médula ósea de ratón. Para la obtención de células de médula ósea, un ratón fue sacrificado por dislocación cervical obteniendo ambos fémures. La epífisis fue perforada y haciendo fluir medio IMDM suplementado con 10 % de SFB se extrajeron las células totales de la médula ósea. Posteriormente, se aislaron las células mononucleadas mediante gradiente de densidad empleando hystopaque ($\delta=1.077\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo), evaluándose el número celular por conteo en cámara de Neubauer

bajo el microscopio a 10x y la viabilidad por la técnica de exclusión al azul tripano (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo).

Caseinato de sodio (CasNa). El CasNa (Spectrum USA) se solubilizó en PBS (solución estabilizadora de fosfatos) y esterilizó por autoclave, preparando una solución patrón de 100 mg/mL. Para los estudios *in vitro* se realizaron diluciones en PBS para llegar a las concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg/mL. En los estudios *in vivo*, se administró 1 mL de CasNa al 10 % (p/v) en PBS por vía intraperitoneal (i.p.) cada 48 h.

Proliferación. Para evaluar la proliferación celular 2.0×10^4 células WEHI-3 o 1.0×10^5 CMN se cultivaron durante 72 o 120 h (CMN), con o sin CasNa en placas de 24 pozos (Costar, USA). Después de este tiempo, el cultivo se fijó con glutaraldehído (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 1.1% y se tiñó con cristal violeta (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en ácido fórmico al 0.1%. El colorante se solubilizó con ácido acético al 10% y la absorbancia se determinó con un lector de placas TECAN (TECAN Spectra, Switzerland) a 570 nm.

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

Adicionalmente, la actividad metabólica como parámetro de viabilidad celular en cultivos de células WEHI-3, CMN o cocultivo de ambas, se cuantificó mediante el

CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Madison, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, después de 120 h con o sin CasNa, se adicionaron 20 μ l de CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent a la placa y se incubó durante 4 h dentro de la incubadora. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de 96 pozos TECAN (TECAN Spectra, Switzerland).

Establecimiento de cocultivo de células WEHI-3 y CMN. Las células WEHI-3 fueron cultivadas en placas de 24 pozos (Corning NY, USA) a una densidad inicial de 3.0×10^3 , 1.0×10^3 , 0.75×10^3 o 0.5×10^3 células/mL y la proliferación y viabilidad se evaluó a las 120 h como se indicó previamente.

Una vez determinada la densidad inicial que permitía cultivar hasta por 120 h las células WEHI-3 con más de 90% de viabilidad, se estimularon con CasNa, tan sólo 0.75×10^3 células/mL en las condiciones especificadas para el cultivo de CMN, es decir 15% de SFB, 5% de suero equino (SE) y 5 ng/mL de interleucina 3 recombinante de ratón (rIL3) como factor de crecimiento y la proliferación celular se evaluó después de 120 h de cultivo.

Verificado el efecto inhibitorio de CasNa sobre las células WEHI-3 a pesar de la adición rIL-3, se cultivaron células WEHI-3, CMN (1.0×10^5 CMN/mL) o cocultivo de ambas (0.75×10^3 células WEHI-3/mL mas 0.5×10^3 CMN/mL) por 120 h en presencia o ausencia de CasNa y se evaluó la proliferación y viabilidad como se indica previamente.

Morfología. La diferenciación morfológica de cultivos individuales de WEHI-3, CMN y cocultivo de ambas se evaluó en citocentrifugados sobre un portaobjetos.

Brevemente, se dejó secar por 5 minutos y posterior a su fijación con metanol se tiñó por 5 minutos con el colorante Wright (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los criterios para determinar el estadio de diferenciación fue el descrito por **Diggs, 1971; Cartwright, 1973 y McDonald et al., 1998.**

Progenitores de granulocitos:

Mieloblastos: células con núcleo redondo y cromatina laxa con uno o más nucléolos (5 y menos es la regla) con alta relación núcleo citoplasma. El núcleo ocupa alrededor del 75% de la célula, es redondo o ligeramente ovalado, se tiñe de color rojo púrpura y tiene un patrón de cromatina muy fina. Citoplasma de volumen pequeño, aspecto suave no granular y manchas moderadas de color azul.

Promielocitos: células con núcleo redondo y excéntrico, ocupa más de la mitad de la célula. La cromatina sigue siendo fina, pero es más gruesa (densa) que en mieloblastos. Un nucléolo prominente o 2 a 3 que se desvanecen. Citoplasma azul pálido a basófilo dependiendo de la cantidad de RNA presente. Número variable de gránulos azurófilos grandes, de color azul a rojo-púrpura (rojo-violeta) que se disponen alrededor del núcleo dejando una zona más clara y agranular, que corresponde a la zona centrosómica.

Mielocitos: células con núcleo excéntrico o céntrico redondo u ovalado. Cromatina más densa y gruesa condensada en cúmulos de color violeta oscuro. Puede estar indentado, similar al metamielocito. No hay nucléolos visibles. El citoplasma se tiñe con menor intensidad (ha perdido toda su basofilia) y son visibles parches de color azul en el borde del citoplasma donde el RNA es todavía presente. Granulación secundaria específica color rojo ladrillo (eosinofilos), negro o azul (basofilos) o lila (neutrofilos).

Metamielocitos: células con núcleo azul oscuro a violeta reniforme al iniciar su indentación con la parte convexa hacia la periferia y la cóncava hacia el centrosoma. Cromatina condensada en numerosos cúmulos cromáticos. Nucleolos ausentes. Citoplasma de

moderado a abundante con algunos gránulos primarios. Aunque ha perdido todo rastro de color azul (basofilia), puede contener un color azul claro y pocas zonas de color rosa. Granulación secundaria específica de color rosa a púrpura, distribuida uniformemente

Progenitores de monocitos:

Monoblasto: células de núcleo ovoide, redondo o irregular con una luz, color púrpura-azul. Puede ser céntrico o excéntrico. Cromatina muy laxa con la apariencia de encaje. Generalmente más de 5 nucléolos o solo uno muy grande o dos es lo común. Citoplasma agranular y mas abundante que en mieloblastos, intensamente (moderadamente) basófilo, tonalidad azul plomiza (gris).

Promonocito: célula de núcleo ovoide pero también doblado, de forma retorcida, tortuoso, irregular o indentado (profundo). Una característica distintiva es la existencia de un pliegue central prominente conocido como “aspecto de gorra”. Cromatina más condensada, pero todavía conserva rasgos finos y de encaje. Uno o dos nucléolos visibles. Citoplasma abundante y no granular (de existir gránulos son azurófilos rojo-azulados), con el aspecto de vidrio esmerilado intensamente basófilo (riqueza de polirribosomas). Es posible ver partículas rojas similares a polvo.

Células granulocíticas maduras:

Células en banda (Stab): células de núcleo con indentación adicional que le hace tomar la forma de “C” o “S”. Es tan retorcido que los filamentos no se pueden ver, pero conserva su forma característica. Nucléolos ausentes. Citoplasma de color rosa pálido y gránulos lilas pero no azul-rosa.

Granulocito segmentado o neutrófilo polimorfonuclear (PMN): células de núcleo abundante, puede contener gránulos primarios. Son característicos granulos secundarios de color rosado a rosa-violeta. Citoplasma lobulado, cada lóbulo picnótico (cromatina

muy densa y en grumos) está conectado por un delgado filamento. El número de filamentos normalmente van de dos a cinco.

Células monocíticas maduras:

Monocito: célula cuyo núcleo tiende a plegarse, o adquirir forma variable (fetal). Cromatina densa, de color azul-púrpura, con patrón reticular fino. Nucléolos presentes en el 50% de los núcleos pero invisibles. Citoplasma abundante de color gris-azulado, aún con apariencia de vidrio esmerilado y borde irregular que puede formar pseudópodos romos. Puede presentar vacuolas y ser numerosas en células fagocíticas activas. Gránulos azurófilos de color rojo “polvo fino”, distribuidos de manera uniforme.

Macrófago: célula de núcleo pequeño con relación al citoplasma, adopta una forma variable (redondeada, oval, incurvada, bilobulada) situándose generalmente, en un extremo de la célula. La cromatina, típicamente reticulada, puede contener uno o dos nucleolos de tonalidad basófila. El citoplasma incoloro o débilmente basófilo se caracteriza por su gran extensión y por sus límites imprecisos. Algunas veces puede contener abundante granulación azurófila y vacuolas.

Análisis de fragmentación del DNA. La detección de DNA fragmentado/degradado en las células tratadas o no con CasNa se realizó como se describe en Ramírez-Ortega *et al.*, 2006. Brevemente, 1×10^6 de células WEHI-3, CMN o cocultivo de ambas, fueron sometidas a lisis con NaCl 10mM pH 8.0, EDTA 25 mM pH 8.0, Tris-Cl 10 mM pH 8.0, SDS 0.5% p/v y 0.1 mg/mL de proteinasa K durante 4 horas a 37.5°C con agitación. Posteriormente, se añadieron 7.5 μ L de ribonucleasa A (Sigma Aldrich, USA) por 1 hora a 37.5°C; pasado este tiempo al DNA se le agregaron 300 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico 25:24:1 y se mezcló por vortex durante 60 segundos, a continuación se

centrifugó a 18000 rpm durante 30 minutos a 4°C; pasado este tiempo se recuperó la fase orgánica a la cual se le adicionó 900 µL de acetato de sodio 3.0 M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol a 4°C, se combinó por inversión durante 1 minuto y se recuperó por centrifugación a 18000 rpm durante 30 minutos a 4°C, el botón se resuspendió en 20 µL de buffer TE (EDTA 0.5 M pH 8.0, Tris-Cl 1M pH 8.0, agua DEPC) se dejó reposar 12 h y enseguida se analizó la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% adicionado con 50 µL de BrEt 10 mg/mL. Se colocaron 8 µl del producto y 2 µl de colorante (Loading Buffer al 1%) utilizando una cámara de electroforesis (Electroforetic gel system, VWR) a voltaje constante de 100 volts durante 60 minutos. El gel fue visualizado en un transiluminador UV (FotoDyne) y se fotografiaron geles representativos.

Modelo de leucemia en ratones BALB/c empleando células WEHI-3. Para establecer el modelo de leucemia *in vivo*, células WEHI-3 en cultivo se lavaron dos veces con PBS, se confirmó que la viabilidad fuera igual o superior al 95 %, y se ajustó una concentración de células de 1.0×10^5 , 2.5×10^5 , 5.0×10^5 o 1.0×10^6 células WEHI-3 en 500 uL de PBS como vehículo para ser inoculadas intraperitonealmente (i.p.) a ratones hembra BALB/c de 8 a 12 semanas de edad. Se construyeron grupos experimentales con 10 ratones y se dio seguimiento a la supervivencia durante 40 días. Se determinó la sobrevivencia, comportamiento y estado general de salud cada tercer día y adicionalmente la leucemia fue confirmada por necropsia. El bazo, hígado y tumores sólidos fueron diseccionados y pesados para posteriormente, determinar el índice respectivo como el cociente del peso del órgano sobre el peso corporal.

Electroporación de células WEHI-3 con el vector pEGFP-C1. Para verificar la presencia de células leucémicas en la médula ósea, se electroporaron células WEHI-3 con el vector pEGFP-C1 (Clontech). Brevemente, cultivos al 60 % de confluencia se cosecharon y lavaron con IMDM-GlutaMAX-I (Gibco-BRL, CA, EE.UU.) a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó el botón celular (5×10^6 células/mL) por 5 min con o sin 5 μ g de pEGFP-C1 en 0.8 ml de medio de electroporación hiposmolar Opti-MEM (Gibco-BRL, CA, EE.UU.) a 4°C. En seguida, se electroporó a 250 V con un Multiporator (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) en cubetas de electroporación desechables estériles (0.8 mL) con una diferencia de 4 mm entre los electrodos de aluminio embebidos (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y 8 minutos después del pulso eléctrico, las células se transfirieron suavemente a 4 mL de IMDM-GlutaMAX-I suplementado con FBS al 10% y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO² más 0.35 mg/mL de geneticina (Invitrogen) como antibiótico de selección durante 2 semanas. Posteriormente, las células fueron mantenidas en IMDM suplementado al 10% de SFB más 0.35 mg/mL de geneticina hasta su uso.

Identificación de células WEHI-3 *in vivo*. Se tomó una muestra de cultivo de células WEHI-3 seleccionadas con geneticina y se verificó en cajas terasaki (Sarstedt, Alemania) bajo un microscopio de fluorescencia la marca fluorescente y posteriormente se ajustó la concentración de células WEHI-3 a 1×10^6 células y se inocularon i.p. como se indica previamente. 24 h después, se recuperaron las células de la médula ósea de ambos fémures. Se obtuvieron células mononucleadas por gradiente de Histopaque como se indica antes y una muestra celular se visualizó en un microscopio de fluorescencia.

Alternativamente, se inocularon 2.5×10^5 células WEHI-3 como se indica previamente y 24, 48, 72 h y 10 días después se recuperaron las CMN de ambos fémures llevándolas a cultivo *in vitro* en ausencia de rmlL-3 como factor de crecimiento exógeno y la proliferación se evaluó a los 120 h como se indicó antes.

Actividad antileucémica del CasNa en ratones BALB/c. Se indujo leucemia en ratones hembra BALB/c como se indicó previamente y se dividieron en grupos experimentales con 10 ratones cada uno. Se administró 1 ml de vehículo o CasNa al 10 % (p/v) cada 48 h durante 40 días dando seguimiento a la sobrevivencia. Adicionalmente se determinaron los índices hepático, esplénico y tumoral así como la presencia de células WEHI-3 en la médula ósea de ratones leucémicos con o sin tratamiento de CasNa, en función de la capacidad de células mononucleadas de proliferar *in vitro* en ausencia de rmlL-3.

RESULTADOS

EL CasNa INHIBE LA PROLIFERACIÓN E INDUCE DIFERENCIACIÓN MONOCÍTICA, PERO NO ALTERA LA VIABILIDAD DE CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3 A 72 h DE CULTIVO.

Para confirmar que el CasNa inhibe la proliferación de la línea de leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3, cultivamos las células por 72 h sin y con diferentes concentraciones de CasNa y evaluamos tanto la proliferación por cristal violeta, como la viabilidad por exclusión al azul tripano y el estado de diferenciación celular en un citocentrifugado teñido con Wright. Encontramos que en presencia de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL el CasNa inhibe la proliferación de manera significativa a partir de los 0.5 mg/mL (Figura 5A), y en ninguna concentración altera la viabilidad (Figura 5B). Es interesante mencionar que a 2.0 mg/mL induce fuertemente la transición de células blásticas (Figura 6A) hacia células monocíticas (Figura 6B).

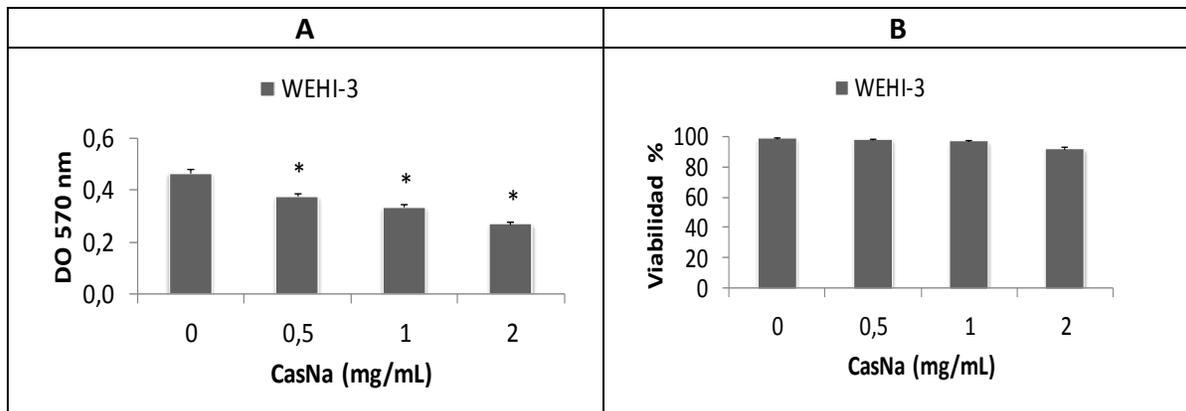


Figura 5. CasNa inhibe la proliferación pero no altera la viabilidad de células WEHI-3 a 72 h de cultivo. A) Proliferación y B) viabilidad de células WEHI-3 en presencia de diferentes concentraciones de CasNa o solo PBS como vehículo (0 mg/mL). Evaluación por cristal violeta en A y exclusión al azul tripano en B. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de 3 ensayos independientes. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto a control (0 mg/mL) en el ANOVA Dunnet.

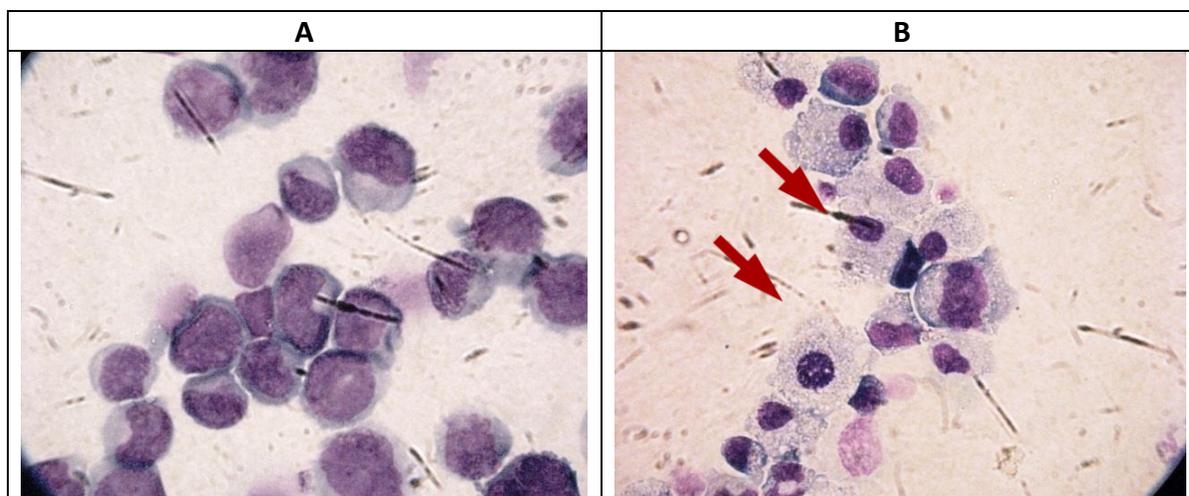


Figura 6. Morfología de células WEHI-3 después de 72 h de cultivo. Imagen representativa de células WEHI-3 sin y con 2 mg/mL de CasNa (A y B respectivamente). Tinción con Wright 100x. Se muestran formas blásticas en A y las flechas en B, indican las formas monocíticas referidas en el texto.

EL CasNa POTENCIA LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SIN REDUCIR LA VIABILIDAD DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA NORMAL A 120 h DE CULTIVO.

Posteriormente evaluamos si el CasNa tenía el mismo efecto inhibitor sobre CMN cuando éstas eran cultivadas durante 120 h en presencia de su inductor a la proliferación el rmlL-3 a 5 ng/mL. Encontramos que a las concentraciones de CasNa en que se inhibió la proliferación de células leucémicas WEHI-3, se potencia aquella de las CMN (Figura 7A y B).

Morfológicamente los cultivos de CMN con rmlL-3 en ausencia de CasNa presentan formas blásticas, precursores de granulocitos, células maduras en banda y monocitos (Figura 8A), pero con CasNa se observa un incremento en el número de monocitos, al mismo tiempo que se acentúan las características distintivas de este linaje, como son la forma irregular, reducción en el tamaño del núcleo y la presencia de vacuolas (Figura 8B).

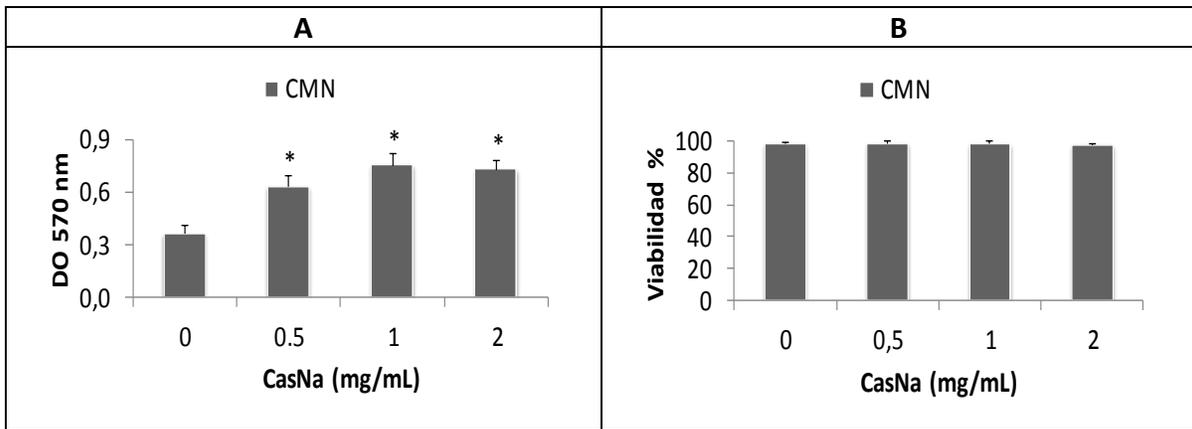


Figura 7. CasNa potencia la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal sin reducir la viabilidad a 120 h de cultivo. A) Proliferación y B) viabilidad de CMN, en presencia de diferentes concentraciones de CasNa o solo PBS como vehículo (0 mg/mL). Evaluación por cristal violeta en A o exclusión al azul tripano en B. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de 3 ensayos independientes. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto a control (0 mg/mL) en el ANOVA Dunnett.

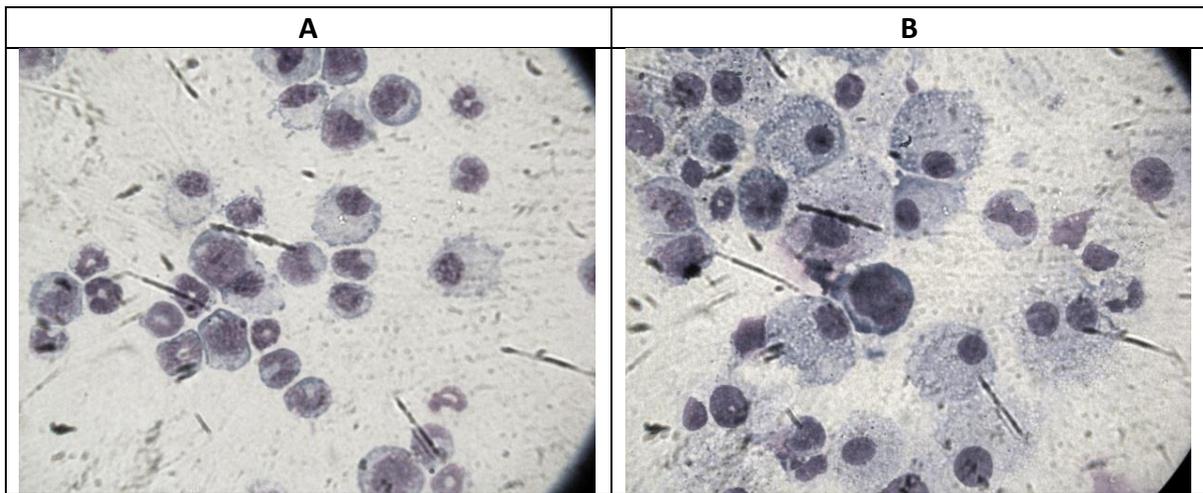


Figura 8. Morfología de CMN después de 120 h de cultivo. Imagen representativa de células mononucleadas en presencia de 5 ng/mL de rMLL-3 sin y con 2 mg/mL de CasNa (A y B respectivamente). Tinción con Wright 100x.

Estos datos sugieren que el CasNa tiene un efecto opuesto en lo que respecta a la inducción a la proliferación sobre células leucémicas y hematopoyéticas normales. Como en la médula ósea de un paciente con leucemia coexisten tanto células malignas como normales, nos preguntamos si el efecto diferencial de CasNa, se

conservaría al ser aplicado en ésta. Para ello diseñamos un cocultivo de células mononucleadas normales con leucémicas WEHI-3, lo cual implica que en un mismo pozo de cultivo se den condiciones favorables para la proliferación de ambos tipos celulares y que la evaluación del efecto que pudiera tener el CasNa se pudiera evaluar al mismo tiempo.

LA DENSIDAD DE 0.5×10^3 CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3/mL INICIALES, ES SUFICIENTE PARA OBTENER PROLIFERACIÓN A 120 h CON VIABILIDAD IGUAL AL 90%.

En trabajos previos hemos mostrado que para evaluar la proliferación de CMN en presencia de rmlL-3 se necesitaban como mínimo 120 h de cultivo con 5 ng/mL de este factor inductor; en cambio para mantener en proliferación a WEHI-3 solo se necesitaban de 72 h, por lo que fue necesario para establecer las condiciones cocultivo de ambos tipos celulares determinar la densidad inicial de WEHI-3 para poderla mantener en proliferación por 120 h con células viables (viabilidad mayor al 90%).

Para conocer la densidad óptima inicial de WEHI-3, se cultivaron de 0.5×10^3 a 3.0×10^3 células WEHI-3/mL por 120 h y se evaluó la proliferación y viabilidad por conteo directo en una cámara de Neubauer y por exclusión al azul tripano respectivamente. Encontramos que 0.5, 0.75 y 1.0×10^3 células WEHI-3/mL iniciales son suficientes para obtener proliferación a 120 h con viabilidad igual o mayor al 90% (Figura 9A y B), mientras que con 2.0 y 3.0×10^3 células/mL la viabilidad disminuyó importantemente hasta ser menor al 10% con 3.0×10^3 . Considerando que a partir de 1.0×10^3 células/mL, el medio de cultivo se

encontraba con un pH ácido que se sabe no permite la continua proliferación de estas células y que la superficie de cultivo ya estaba saturada, se eligió a 0.75×10^3 células/mL como densidad celular inicial para los nuestros ensayos posteriores de proliferación.

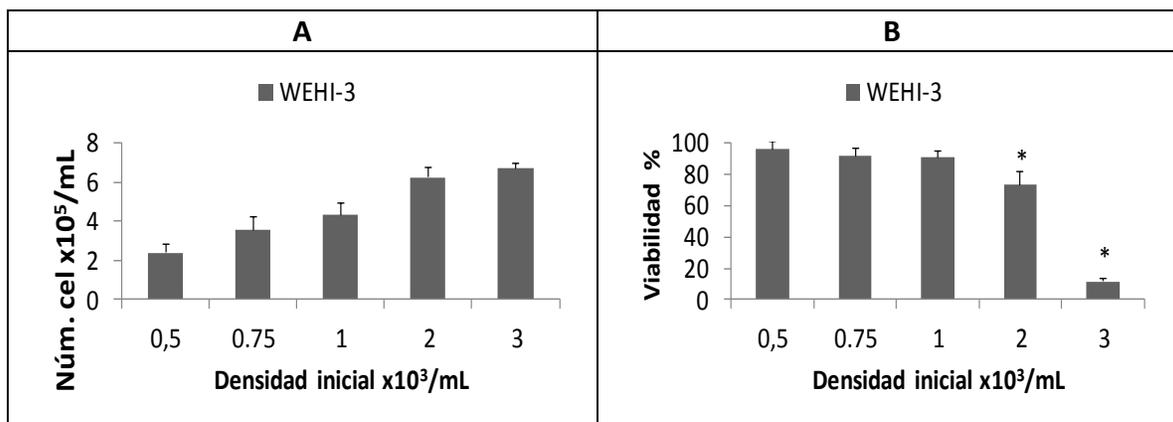


Figura 9. 0.5×10^3 células WEHI-3/mL iniciales son suficientes para obtener proliferación a 120 h con viabilidad igual al 90 %. A) Proliferación y B) viabilidad de células WEHI-3 en diferentes densidades iniciales. Evaluación por cristal violeta y exclusión al azul tripano respectivamente. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de un ensayo representativo. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto a control (0.5×10^3 células WEHI-3/mL) en el ANOVA Tukey.

EL CasNa INHIBE LA PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD DE CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3 A 120 h DE CULTIVO, INDEPENDIENTEMENTE DE LA PRESENCIA DE rmlL-3.

Una vez que se determinó en nuestras condiciones de cultivo la densidad celular inicial de WEHI-3 para cultivos a 120 h para mantener a las células en proliferación y viables, analizamos si el CasNa a 2.0 mg/mL inhibía la proliferación en este tiempo, tanto en presencia, como ausencia de rmlL-3. Encontramos que en efecto se produjo una importante inhibición. De manera notable, observamos

que el CasNa disminuyó la viabilidad de los cultivos de células WEHI-3 en un 80% con o sin rmlL-3 (Figuras 10A y B).

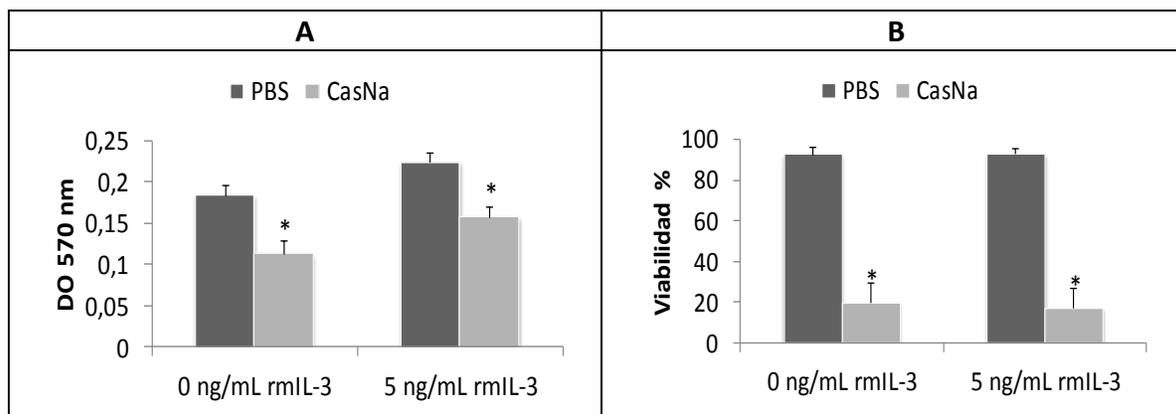


Figura 10. CasNa inhibe la proliferación y viabilidad de WEHI-3 a 120 h de cultivo, independientemente de la presencia de rmlL-3. A) Proliferación y B) viabilidad de células WEHI-3 en ausencia (0 ng/mL rmlL-3) o presencia de rmlL-3 (5 ng/mL rmlL-3) sin y con 2 mg/mL de CasNa (PBS y CasNa respectivamente). Evaluación por cristal violeta en A y exclusión al azul tripano en B. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de un ensayo representativo. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto a PBS en el ANOVA Dunnet.

EL CasNa INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3 PERO POTENCIA LA DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA NORMAL Y DEL COCULTIVO DE AMBAS, MANTENIENDO LA ACTIVIDAD METABÓLICA.

Cuando evaluamos la proliferación tanto de WEHI-3, de las CMN, como de los cocultivos de ambas en presencia de rmlL-3, observamos que la proliferación inducida era similar cuando se usó CMN o en los cocultivos y que además este factor inducía fuertemente la proliferación de WEHI-3. Cuando los cultivos se hicieron en presencia de 2.0 mg/mL de CasNa observamos que se potenció la proliferación tanto de CMN como del cocultivo con WEHI-3, pero se inhibió aquella en el cultivo con solo WEHI-3 (Figura 11A).

De manera sorprendente sólo en los cocultivos se presentó una significativa pérdida de viabilidad celular (Figura 11B). A pesar de que encontramos un número celular similar en los cultivo con CMN y en los cocultivo, estos últimos al tener una menor reducción de MTS nos sugiere que presentan una disminución en su actividad metabólica.

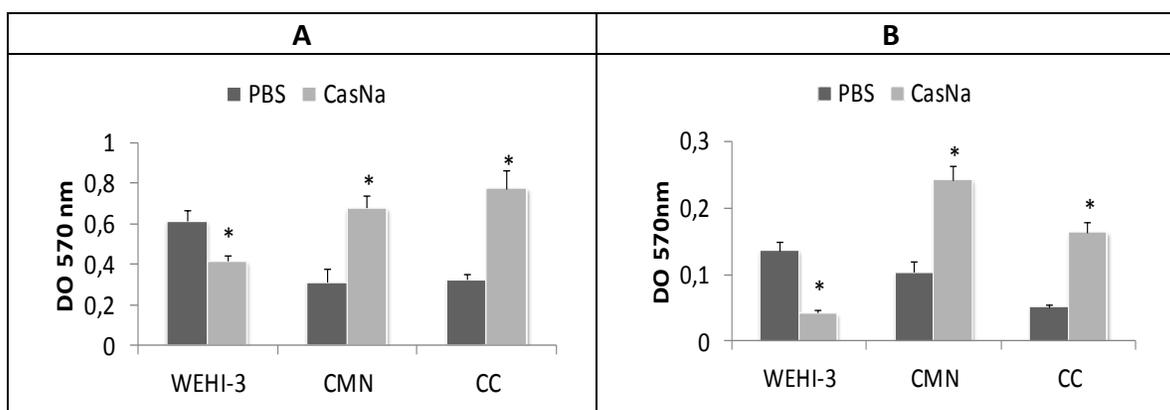


Figura 11. CasNa inhibe la proliferación de WEHI-3 pero potencia la de mononucleadas de médula ósea normal y del cocultivo de ambas manteniendo la actividad metabólica. A) Proliferación y B) actividad metabólica de células WEHI-3, CMN y cocultivo de ambas (CC) en presencia de 5 ng/mL de rIL-3 más 2 mg/mL de CasNa o solo PBS como vehículo. Evaluación por cristal violeta y MTS respectivamente, la absorbancia fue leída a 570 nm. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de 3 ensayos independientes. Significancia estadística * $p < 0.05$ en el ANOVA Tukey.

EL CasNa INDUCE SOBRE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3, CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA NORMAL Y EL COCULTIVO DE AMBAS DIFERENTES CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN.

Al observar el cocultivo sin CasNa (Figura 12E), hay una mayor proporción de células adheridas en comparación a los cultivo individuales de WEHI-3 y CMN, lo cual se incrementa en presencia de CasNa (Figura 12B y C respectivamente). Llama la atención que en los cultivos individuales de células WEHI-3, el CasNa indujo agregación de las células en suspensión (Figura 12B).

Para tener una mejor descripción de la morfología de las células, se realizaron citocentrifugados y se tiñeron con Wright. En los cultivos con WEHI-3 en ausencia de CasNa se observó que se disminuye el número de formas blásticas, evidenciado por la reducción en el tamaño del núcleo, menor intensidad de tinción citoplasmática y aparición de regiones condensadas de cromatina, lo que sugiere compromiso de diferenciación (Figura 13A).

De manera interesante, en presencia de CasNa hay una reducción generalizada en el tamaño de las células y picnosis nuclear en formas que sugieren apoptosis (Figura 13B). Por otro lado, en el cultivo de sólo CMN con rmlL-3 se observan formas blásticas, precursores de granulocitos, células maduras en banda y monocitos (Figura 13C), y con CasNa, se acentúa la forma irregular, mayor proporción del citoplasma respecto al núcleo y la presencia de vacuolas (Figura 13D).

Por su parte llama la atención que en el cocultivo tanto con o sin CasNa, prevalecen las células maduras en banda y monocitos típicos de la CMN, pero no células con características morfológicas similares a WEHI-3. Es más en presencia de CasNa tampoco se observaron células de tamaño reducido y picnóticas como ocurre en los cultivos de WEHI-3 más CasNa (Figura 13B).

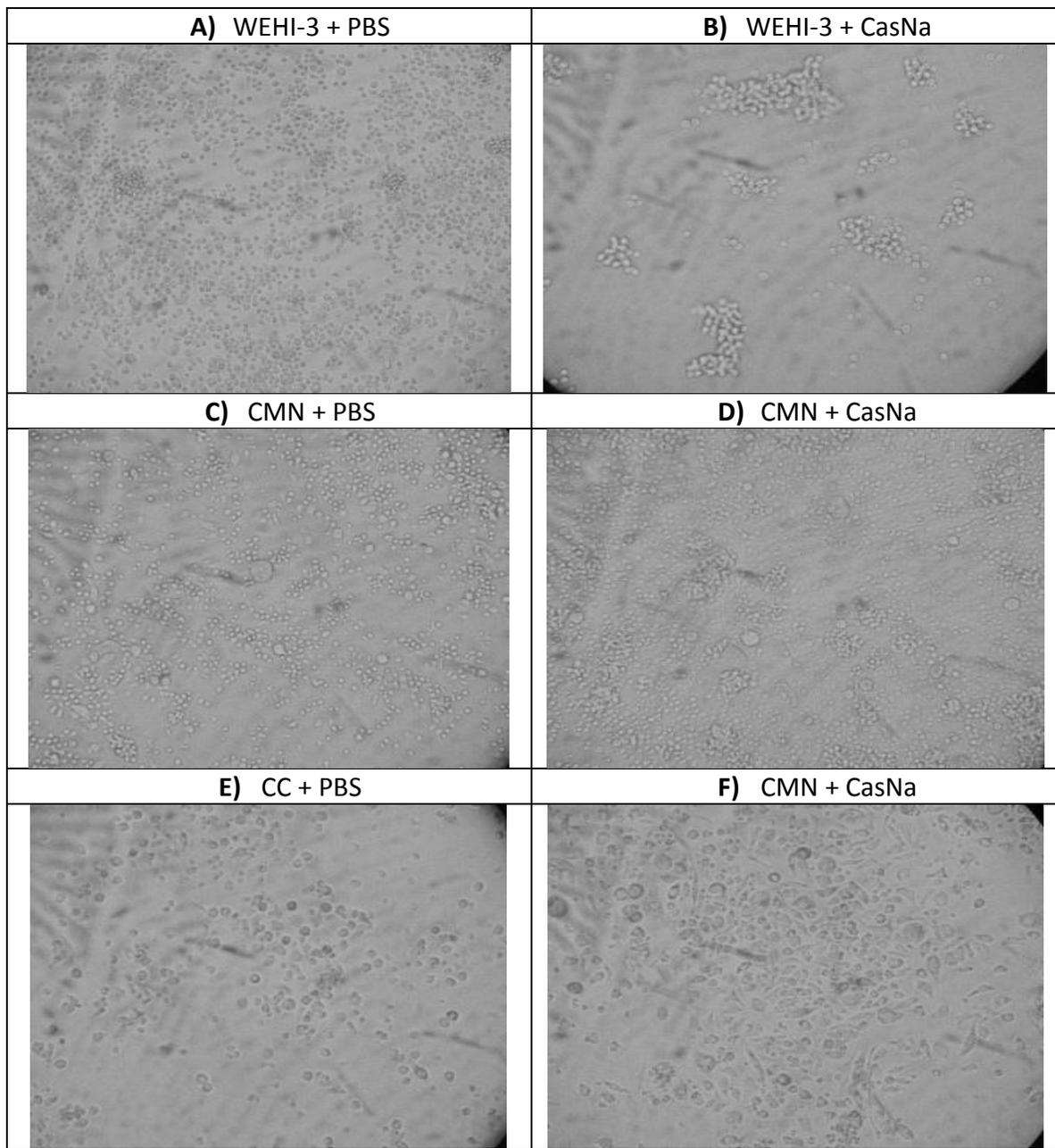


Figura 12. Cultivos de WEHI-3, mononucleadas de médula ósea normal y cocultivo de ambas con 5 ng/mL de rml-3 a 120 h de cultivo. A y B) células WEHI-3, C y D) CMN o E y F) cocultivo de ambas respectivamente. Imágenes representativas a 20x.

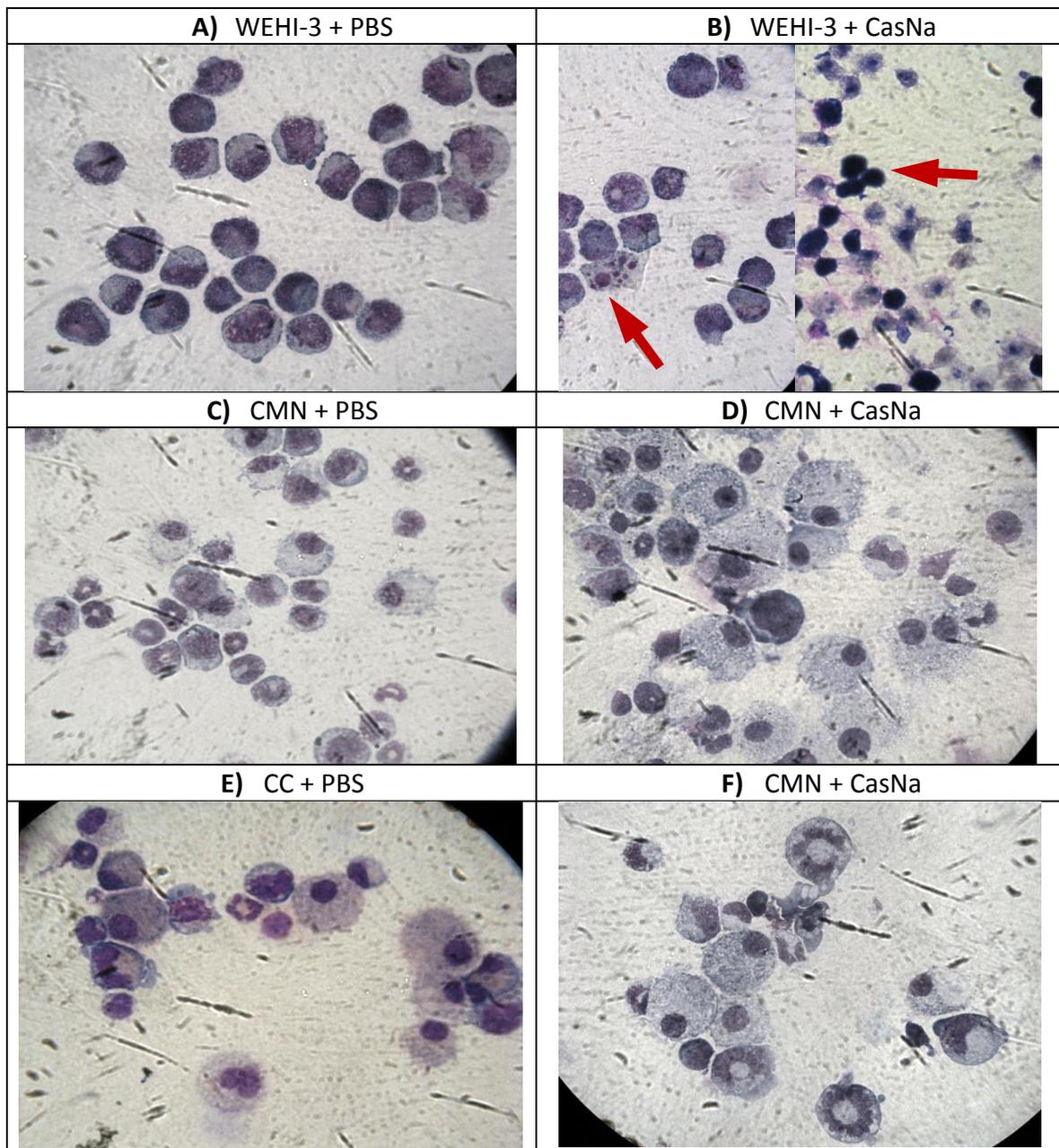


Figura 13. Diferenciación de WEHI-3, mononucleadas de médula ósea normal y cocultivo de ambas con 5 ng/mL de rmlL-3 a 120 h sin y con CasNa. A y B) células WEHI-3, C y D) CMN, E y F) cocultivo de ambas respectivamente sin y con 2 mg/mL de CasNa respectivamente. Imágenes representativas a 100x.

EL CasNa INDUCE FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3 Y COCULTIVO PERO NO EN MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA NORMAL.

Cuando analizamos si existe fragmentación del material genético de todos los cultivos en presencia de CasNa, observamos que aunque existe en los cultivos de WEHI-3 una importante presencia del patrón de *DNA ladder* característico de células apoptóticas, en los cocultivos esta característica apoptótica estaba fuertemente reducida. (Figura 14). De manera interesante este patrón de degradación de material genético en escalera encontrado en los cultivos con WEHI-3 en presencia de CasNa, concuerda con la evidente picnosis morfológicamente detectada en los citocentrifugados (Figura 13B).

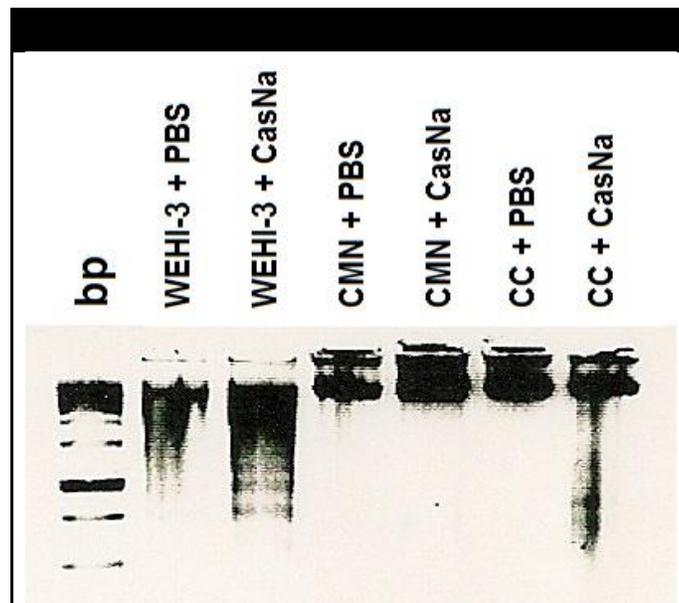


Figura 14. CasNa induce fragmentación del DNA en células WEHI-3 y cocultivo pero no en mononucleadas de médula ósea normal. Integridad del DNA de cultivos de células WEHI-3, CMN o cocultivo de ambas en presencia de 5 ng/mL de rML-3. Marcador de peso molecular (bp); CasNa (2 mg/ml de CasNa). Los resultados son representativos de 2 experimentos por separado usando electroforesis en gel de agarosa.

Nuestros datos sugieren que el CasNa *in vitro* inhibe la proliferación, así como estimula la inducción a la apoptosis de células leucémicas en cocultivos con CMN, por lo que podríamos suponer que este efecto se pudiera también presentar *in vivo*, para verificarlo se reprodujo un modelo de ratón ampliamente usado para analizar el potencial antileucémico de moléculas en investigación (**Shcheblyakov et al., 2011; Gidali et al., 2001**).

LA INOCULACIÓN i.p. DE CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3 A RATONES BALB/c, ES LETAL INDEPENDIENTEMENTE DEL TAMAÑO DE INÓCULO.

Para establecer bajo nuestras condiciones experimentales el modelo de leucemia de WEHI-3 en ratones BALB/c, inoculamos por vía intraperitoneal (i.p.) 1.0×10^5 , 2.5×10^5 , 5.0×10^5 o 1.0×10^6 células WEHI-3/500 μ L y dimos seguimiento a la sobrevivencia por 40 días y observamos la aparición de las tres manifestaciones de enfermedad más comúnmente descritas para este modelo de leucemia que son: generación de tumores sólidos, hepatomegalia y esplenomegalia. En cuanto a la sobrevivencia, encontramos que independientemente del número de células WEHI-3 inoculado, se induce la muerte de todos los ratones (Figura 15) sin embargo, mientras que 1.0×10^6 células WEHI-3 induce la muerte antes de 25 días, se requieren 10 días más para conseguir la misma mortalidad con 5.0×10^5 , 2.5×10^5 o 1×10^5 células WEHI-3.

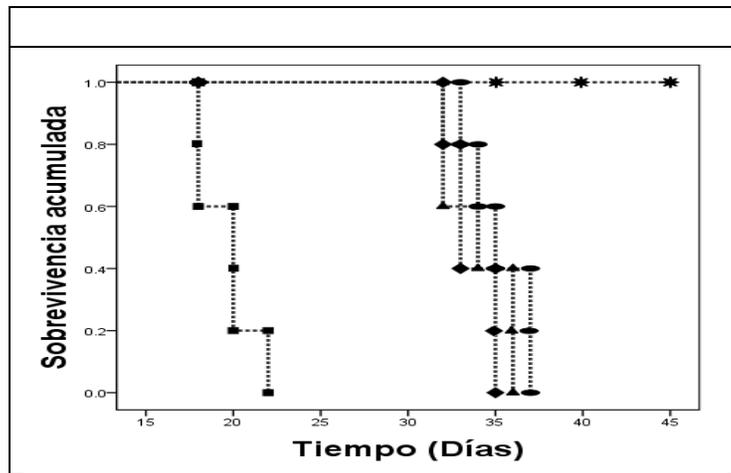


Figura 15. La inoculación i.p. de células WEHI-3 a ratones BALB/c, es letal independientemente del tamaño de inóculo. Supervivencia de ratones hembra BALB/c de 8 a 12 semanas de edad, inoculados con diferentes concentraciones de células WEHI-3 en 500/uL de PBS como vehículo. (★) control de vehículo sin células leucémicas (■) 1×10^6 células leucémicas WEHI-3, (◆) 5×10^5 células leucémicas WEHI-3, (▲) 2.5×10^5 células leucémicas WEHI-3, y (●) 1×10^5 células leucémicas WEHI-3. Kaplan-Meier. n=5 por grupo.

LA INOCULACIÓN i.p. DE CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3 A RATONES BALB/c, INCREMENTA LOS ÍNDICES HEPÁTICO, ESPLÉNICO E INDUCE LA FORMACIÓN DE TUMORES SÓLIDOS.

Al analizar las manifestaciones de enfermedad encontramos que 5.0×10^5 , 2.5×10^5 y 1×10^5 pero no 1.0×10^6 células WEHI-3, inducen la formación de tumores sólidos. Respecto a la generación de hepatomegalia, evaluada como el cociente del peso del hígado sobre el peso corporal (índice hepático), encontramos que únicamente 2.5×10^5 células WEHI-3 lo incrementan de manera significativa respecto al peso del hígado de ratones sin inoculación de células WEHI-3. Por otro lado, la esplenomegalia evaluada como el cociente del peso del bazo sobre el peso corporal (índice esplénico), es inducida con 2.5×10^5 y 1.0×10^5 respecto al peso del bazo de ratones sin inoculación de células WEHI-3 (Figura 16). Por lo anterior, se decidió que 2.5×10^5 células WEHI-3 fuese el tamaño de inóculo para inducir el modelo de leucemia en ensayos posteriores.

	PBS	WEHI-3			
	-----	1x10 ⁶	5x10 ⁵	2.5x10 ⁵	1x10 ⁵
Índice hepático	0.058±0.015	0.072±0.003	0.073±0.023	0.128±0.049 <i>a</i>	0.071±0.033
Índice esplénico	0.004±0.001	0.005±0.000	0.007±0.001	0.009±0.001 <i>a</i>	0.008±0.002 <i>a</i>
Índice tumoral	ND	ND	0.051±0.011 <i>a</i>	0.077±0.024 <i>a</i>	0.017±0.010 <i>a</i>

Figura 16. La inoculación i.p. de células WEHI-3 a ratones BALB/c, incrementa los índices hepático, esplénico e induce la formación de tumores sólidos. Análisis post-necropsia del peso de hígado, bazo y tumor en ratones sin y con inoculación de células WEHI-3. Índice hepático, índice esplénico, índice tumoral, ND no detectado. Se presenta la media +/- desviación estándar de 5 ratones BALB/c por grupo. Significancia estadística * $p < 0.05$ *a* es diferente respecto a control (PBS) en ANOVA Dunnet.

LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS WEHI-3 INOCULADAS i.p. A RATONES BALB/c SE ESTABLECEN EN LA MÉDULA ÓSEA.

Se ha demostrado que células WEHI-3 inoculadas i.p. pueden llegar a establecerse en la MO de ratones BALB/c (**Gamba-Vitalo et al., 1989; Gidali et al., 2001**). Para verificar que bajo nuestras condiciones experimentales, las células WEHI-3 inoculadas por esta vía alcanzan la MO antes de iniciar el tratamiento i.p. de CasNa, las células WEHI-3 fueron transfectadas por electroporación con el vector pEGFP-C1, el cual otorga resistencia al antibiótico geneticina y expresa de manera constitutiva la proteína verde fluorescente GFP, permitiéndonos identificar las células WEHI-3 del resto de las células de la MO de encontrarse en ella. Luego de una semana de selección en cultivo *in vitro* por resistencia al antibiótico geneticina, las células WEHI-3 positivas para fluorescencia fueron inoculadas i.p. a una densidad de 1.0×10^6 células/ratón y 24 h después, se obtuvieron las células totales de la MO de un fémur. Al observar un citocentrifugado a 40x en un microscopio de fluorescencia, se identificaron células verde fluorescentes (Figura 17) lo que demuestra que las células WEHI-3 se encontraban en la MO.

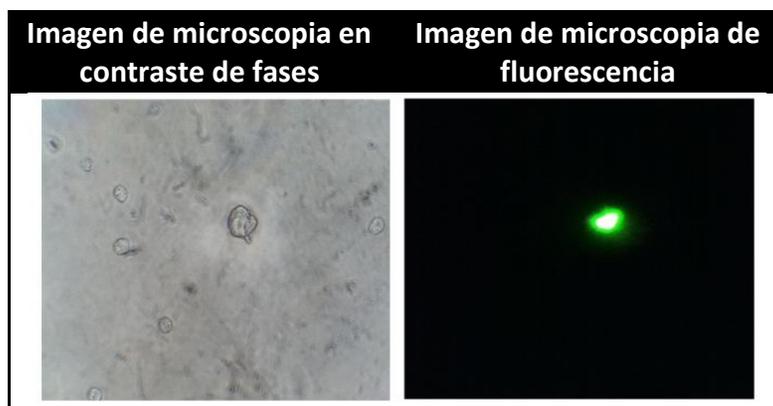


Figura 17. Las células leucémicas WEHI-3/GFP+ alcanzan la médula ósea, 24 h después de ser inoculadas i.p. a ratones BALB/c. ratones BALB/c de 12 semanas de edad fueron inoculados i.p. con 1×10^6 células WEHI-3 en 500 μ L y 24 horas se obtuvieron las células mononucleadas a partir de las células totales de la médula ósea. Imagen representativa a 40x.

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 (Gidali *et al.*, 2001), nos preguntamos si bajo nuestras condiciones CMN de MO de ratones inoculados con células WEHI-3, proliferaban *in vitro* en ausencia de rmlL-3 como inductor de proliferación. Por lo anterior inoculamos i.p. dos grupos de ratones con 2.5×10^5 células WEHI-3 o sólo vehículo (PBS) respectivamente y 1, 2, 3 y 10 días después, se obtuvieron CMN de MO de un ratón de cada grupo. Estas células fueran cultivadas por 120 h en ausencia y presencia de 5 ng/mL de rmlL-3 y posteriormente, se analizó la proliferación. Se encontró que las CMN de ratones inoculados con sólo vehículo proliferan *in vitro* únicamente en presencia de rmlL-3. Las CMN de ratones inoculados con células WEHI-3 extraídas de MO 1, 2 y 3 días después de la inoculación necesitan de la adición de rmlL-3 para proliferar, por el contrario si son extraídas 10 días después, son capaces de proliferar en ausencia de rmlL-3, (Figura 18 y 19A1).

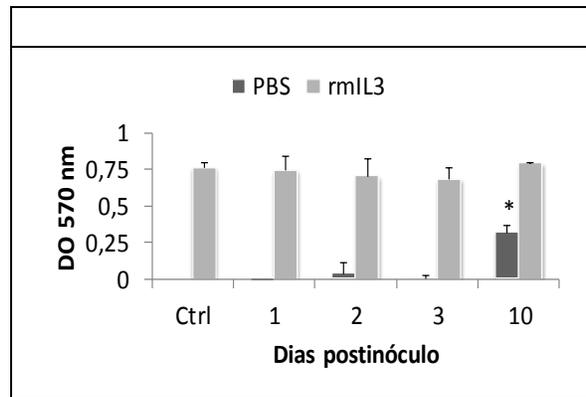


Figura 18. Células mononucleadas de médula ósea de ratones inoculados i.p. con células WEHI-3, proliferan *in vitro* en ausencia de rmIL-3. Proliferación de CMN obtenidas de ratones inoculados o no, con células WEHI-3 en ausencia o presencia de 5 ng/mL de mIL-3 (PBS o rmIL-3 respectivamente). Cada punto representa la media +/- desviación estándar de al menos 3 ensayos independientes. Significancia estadística * $p < 0.05$ en el ANOVA Dunnet.

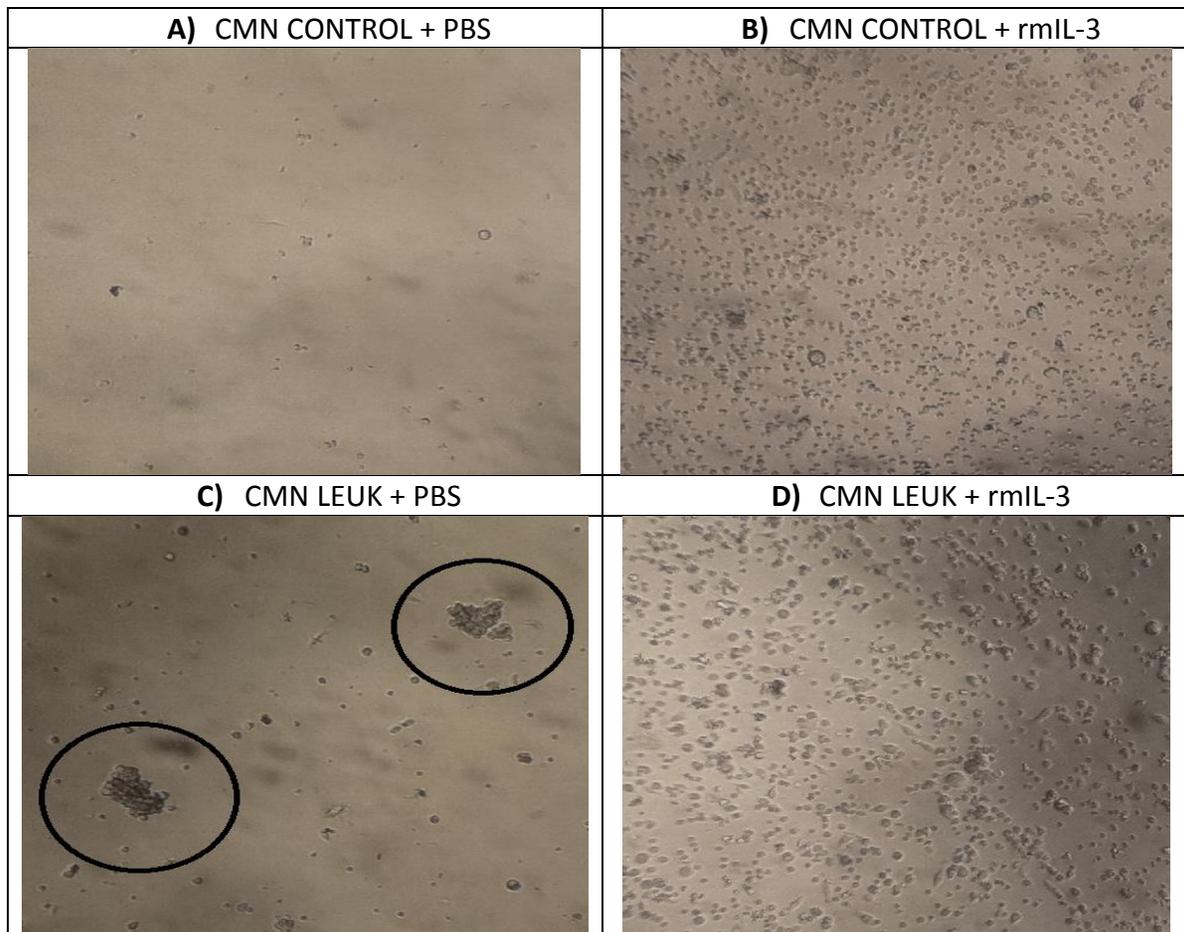


Figura 19. Cultivos de CMN provenientes de médula ósea de ratones control o leucémicos, sin y con 5 ng/mL de rmIL-3 durante 96 h de cultivo. Cultivos de CMN de ratones inoculados i.p. con sólo PBS (cmn CONTROL) o células WEHI-3 (CMN LEUK) en ausencia o presencia de rmIL-3 (PBS y rmIL-3 respectivamente). Las elipsis en B1 indican la presencia de agregados celulares. Imagen representativa a 20x.

EL CasNa PROLONGA LA SOBREVIVENCIA DE RATONES BALB/c LEUCÉMICOS.

Nuestros datos muestran que las células WEHI-3 al ser inoculadas i.p. en ratones BALB/c alcanzan la médula ósea, inducen hepatomegalia y esplenomegalia, la formación de tumores sólidos, la presencia de células en la MO con la capacidad de proliferación *in vitro* en ausencia de inductores a la proliferación celular como el rmlL-3 y finalmente la muerte. Para verificar si el CasNa podía prolongar la sobrevivencia y bloquear la generación de estas manifestaciones de enfermedad, se inocularon i.p. células WEHI-3 o sólo PBS como vehículo y 2 y 10 días postinóculo se administró 1 mL de CasNa (10% p/v) o sólo PBS como vehículo por vía i.p. cada 48 h a los grupos inoculados o no con células WEHI-3. Se encontró que todos los ratones inoculados con células WEHI-3 y tratados con sólo PBS mueren a los 25 días postinóculo. Por el contrario, la sobrevivencia es de 100 y 80% en los grupos tratados con CasNa a partir del día 2 y 10 postinóculo respectivamente. De manera notable, ratones con tratamiento iniciado al día 10 postinóculo no sobrevive mas de 36 días pero el 40% permanece vivo hasta por 40 días si se inicia el tratamiento al día 2 postinóculo (Figura 20).

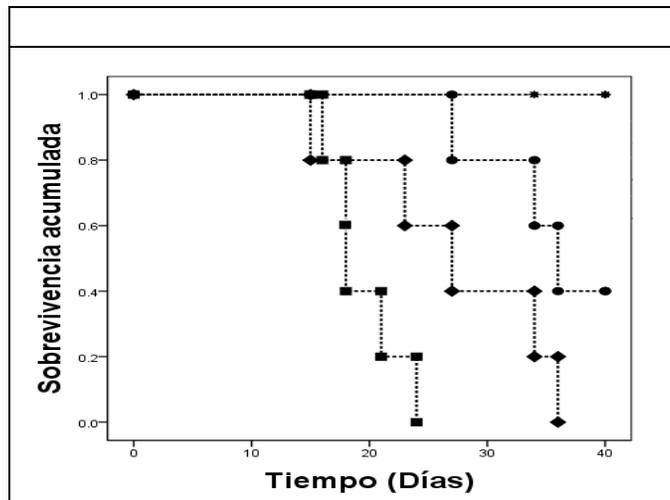


Figura 20. El CasNa prolonga la supervivencia de ratones BALB/c leucémicos. Supervivencia de ratones BALB/c leucémicos tratados con 1 ml de (■) vehículo, (●) CasNa (10 % en PBS p/v) al día 2 post inoculación o (◆) día 10. Se incluye como control ratones sanos no inoculados con células WEHI-3 pero tratados con CasNa cada 48 h desde el día 2. (★). Kaplan-Meier. n=10 por grupo.

EL CasNa REDUCE LA HEPATOMEGALIA Y EL TAMAÑO DEL TUMOR DE RATONES LEUCÉMICOS PERO NO ERRADICA LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS DE LA MÉDULA ÓSEA.

Cuando se analizaron las manifestaciones de la enfermedad en aquellos ratones inoculados con células WEHI-3, se observó que el tamaño del hígado en el grupo con tratamiento de CasNa, fue similar al tamaño del grupo de ratones inoculados con sólo PBS. Respecto al tamaño del bazo no parece existir diferencia entre tratar o no con CasNa siendo estos superiores en tamaño al bazo de ratones inoculados con sólo PBS, por otro lado, el tumor de ratones con tratamiento de CasNa es de menor tamaño que el encontrado en ratones sin tratamiento de CasNa (Figura 21).

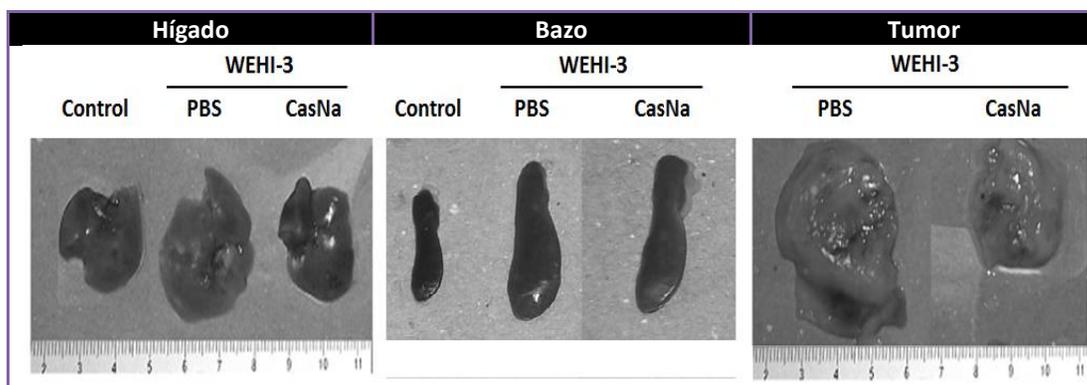


Figura 21. El CasNa reduce el tamaño del hígado y tumor de ratones leucémicos. Imagen representativa de hígado, bazo y tumor de ratones control, leucémicos sin y con tratamiento de CasNa (WEHI-3/PBS y WEHI-3/CasNa respectivamente).

Al comparar los índices hepático, esplénico y tumoral, de los diferentes grupos, se observa que el CasNa reduce de manera significativa el peso del hígado y del tumor pero no del bazo inducidos por la inoculación de células WEHI-3 (Figura 22). Como ha sido mostrado previamente por este grupo de trabajo, la inoculación de sólo CasNa, incrementa el tamaño y peso del bazo pero no del hígado y tampoco induce la formación de tumores ni afecta la sobrevivencia.

	PBS		WEHI-3	
	PBS	CasNa	PBS	CasNa
Índice hepático	0.050±0.005	0.063±0.001	0.111±0.020 <i>a</i>	0.057±0.025 <i>b</i>
Índice esplénico	0.004±0.001	0.009±0.000 <i>a</i>	0.008±0.001 <i>a</i>	0.011±0.002
Índice tumoral	ND	ND	0.091±0.013	0.058±0.014 <i>b</i>

Figura 22. El CasNa reduce la hepatomegalia y el peso del tumor de ratones leucémicos. Análisis post-necropsia de peso de hígado, bazo y tumor (en su caso) expresado como índice hepático, esplénico y tumoral respectivamente en ratones control y leucémicos sin y con tratamiento de CasNa. Se presenta la media +/- desviación estándar de 3 necropsias. Significancia estadística * $p < 0.05$, *a* respecto a PBS/PBS, *b* respecto a WEHI-3/PBS en ANOVA Dunnet.

Como una evidencia de la presencia de células WEHI-3 en la MO de ratones sobrevivientes a la inoculación de células leucémicas y que fueron o no tratados con CasNa, analizamos si existían CMN con la capacidad de proliferar *in vitro* en ausencia de rmlL-3. Encontramos que independientemente de tratar o no con CasNa, todos aquellos ratones que fueron inoculados con células WEHI-3, presentan en la MO CMN con capacidad para proliferar en ausencia de rmlL-3 (Figura 23B y C).

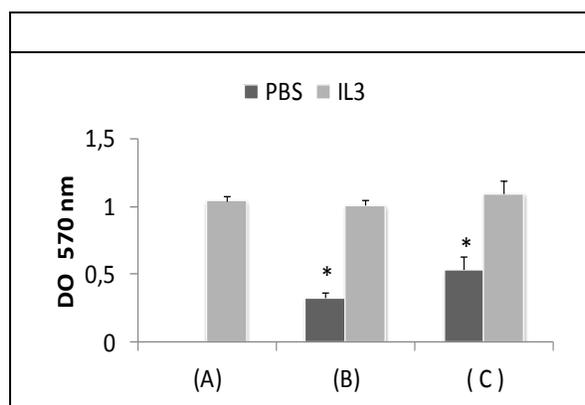


Figura 23. Células mononucleadas de médula ósea de ratones inoculados i.p. con células WEHI-3, tratados o no con CasNa proliferan *in vitro* en ausencia de rmlL-3. Proliferación de CMN obtenidas de ratones inoculados con células WEHI-3 sin y con tratamiento de CasNa (B y C respectivamente) en ausencia o presencia de rmlL-3 (PBS e IL-3 respectivamente). Se incluye como control, (A) CMN de ratones sanos. Cada punto representa la media +/- desviación estándar de 1 ensayo representativo. Significancia estadística * $p < 0.05$ en el ANOVA Dunnet.

Como observamos previamente, CMN extraídas de la MO de ratones que no fueron inoculados con células WEHI-3 (CMN/CONTROL), son incapaces de proliferar *in vitro* a menos que se suplemente el cultivo con 5 ng/mL de rmlL-3 (Figura 24A y B respectivamente).

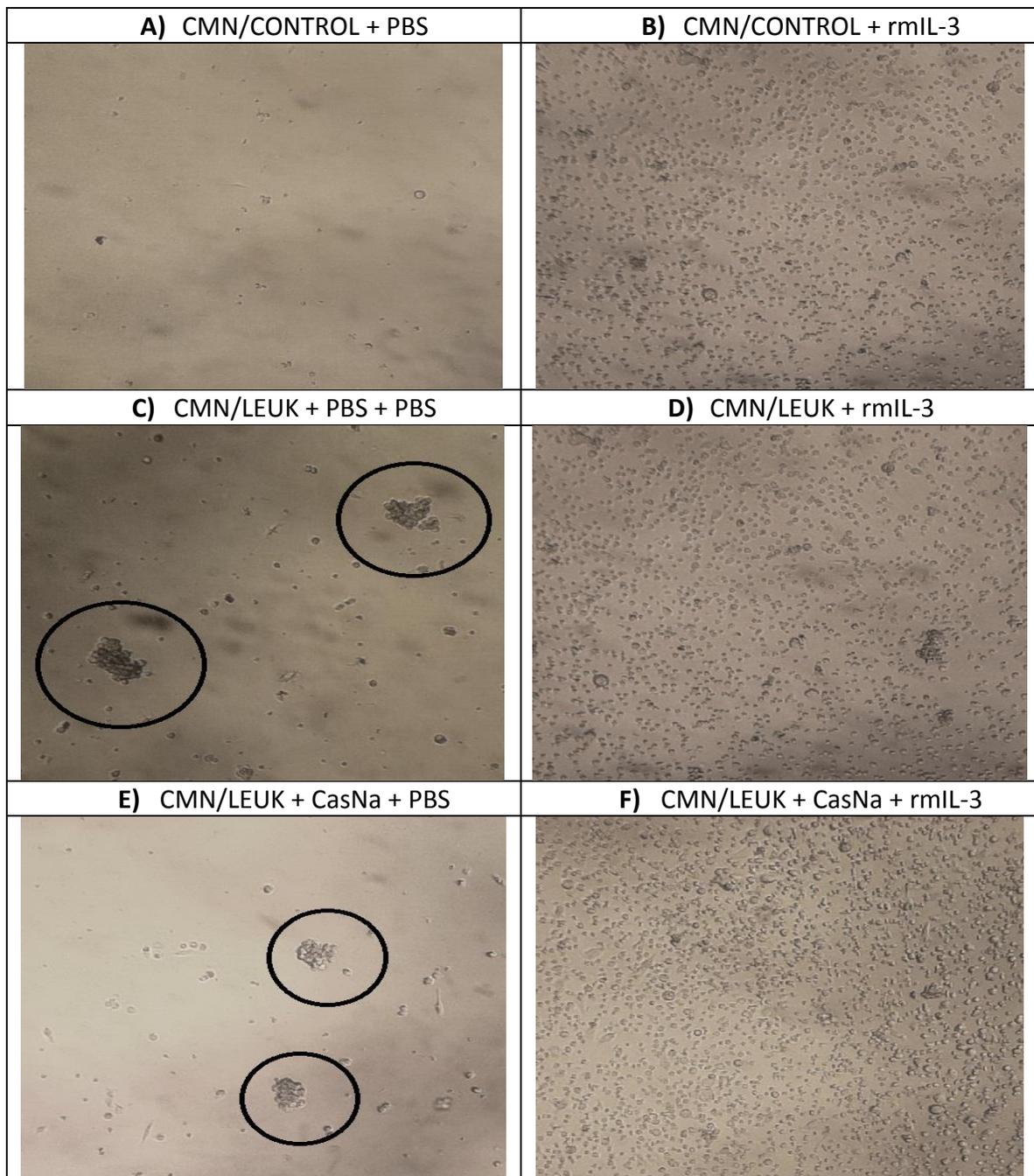


Figura 24. Cultivos de CMN provenientes de médula ósea de ratones control o leucémicos, sin y con tratamiento de CasNa en ausencia o presencia de 5 ng/mL de rmlL-3 durante 96 h de cultivo. Cultivos de CMN de ratones inoculados i.p. con sólo PBS o células WEHI-3 sin y con tratamiento de CasNa (A, B y C respectivamente) en ausencia o presencia de rmlL-3 (1 y 2 respectivamente). Las elipsis en B1 y C1 indican la presencia de agregados celulares. Imagen representativa a 20x.

Para corroborar el carácter maligno de las células que proliferan en ausencia de rmlL-3, se cultivaron y expandieron estas células por una semana y al cabo de la

misma, se inocularon a ratones BALB/c sanos a una concentración de 2.5×10^5 células y se comparó la sobrevivencia de este grupo respecto a la sobrevivencia de ratones inoculados con 2.5×10^5 células WEHI-3. Encontramos que la inoculación de CMN que proliferan *in vitro* en ausencia de rmlL-3, inducen la muerte de todos los ratones en un tiempo similar a las células WEHI-3 independientemente si procedían de la MO de ratones sin o con tratamiento de CasNa, (Figura 25) lo que demuestra que a pesar de prolongar la sobrevivencia y reducir las manifestaciones de enfermedad, el CasNa no erradica las células leucémicas de la MO.

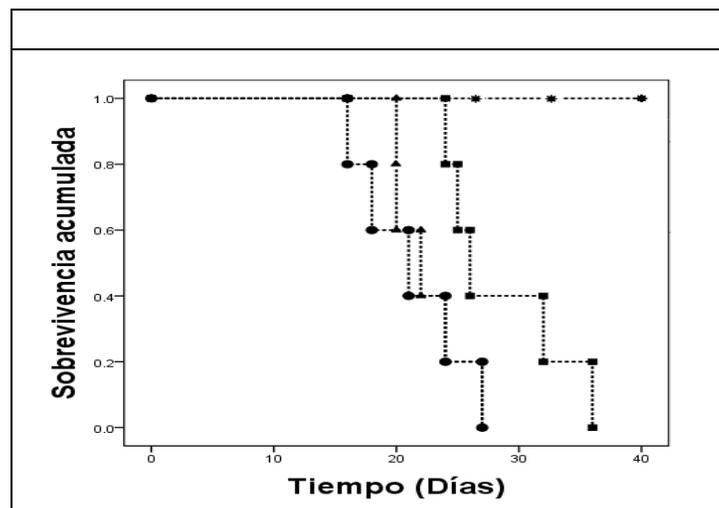


Figura 25. Células mononucleadas de médula ósea obtenidas de ratones BALB/c sin y con tratamiento de CasNa, son tan leucemogénicas como las células WEHI-3. Sobrevivencia de ratones BALB/c inoculados con células mononucleadas de médula ósea expandida *in vitro* de ★) ratones sanos, ●) ratones inoculados con células WEHI-3 y tratados con PBS, ▲) ratones inoculados con células WEHI-3 y tratados con CasNa y ■) células WEHI-3. Kaplan-Meier. n=5 por grupo.

DISCUSIÓN

Las células leucémicas presentan alteraciones fisiológicas que contribuyen a su capacidad de proliferación ilimitada, evasión de los mecanismos de inducción de apoptosis y detención de la diferenciación celular, todos los cuales colectivamente caracterizan su naturaleza maligna (**Hanahan & Weinberg, 2000; Montesinos & Mayani, 2002**). Drogas tales como antraciclinas y citarabina se utilizan normalmente para tratar la leucemia, pero las tasas de supervivencia son bajas, con una esperanza de vida del 60 % a 5 años en pacientes jóvenes y de solo 10% en pacientes de edad avanzada (**Robak, 2009**). La escasa sobrevivencia, aunado a los efectos secundarios y la mala tolerancia al tratamiento, indican la necesidad de nuevas alternativas terapéuticas (**Roboz, 2011**).

En este trabajo se muestra que las células WEHI-3 cultivadas por 120 h con 2 mg/mL de CasNa reducen significativamente la actividad metabólica, al mismo tiempo, exhiben características morfológicas de células diferenciadas, dos parámetros que indican inhibición de la proliferación acoplado a diferenciación celular (**McDonald et al., 1998**). Es conocido que un freno de la proliferación celular, también se puede deber a la inducción de apoptosis (**Guo & Hay, 1999; Smith, 2003**). Al realizar el corrimiento electroforético del material genético de las células WEHI-3 en presencia de CasNa, fue posible observar la aparición del patrón característico de DNA ladder o en escalera, evidencia de la fragmentación internucleosomal del DNA, una característica contundente de la muerte por apoptosis (**Alfaro et al., 2000**) y la técnica por excelencia para la detección de este evento celular (**Taylor et al., 2008; Guimaraes et al., 2012**). En efecto, aunque el proceso apoptótico tiene la capacidad de ser reversible, existe un punto

de no retorno cuando el DNA es fragmentado, por tanto evidencia definitiva de muerte por apoptosis (**Tang et al., 2009**). Así, este conjunto de datos, constituyen evidencias contundentes de que el CasNa inhibe la proliferación, induce diferenciación y muerte celular por apoptosis en las células leucémicas WEHI-3 y se suma a las evidencias de su efecto inhibitorio de la proliferación en líneas de leucemia monocítica J774 y P388 (**Ramos-Mandujano et al., 2008**).

La inhibición de la proliferación, inducción de diferenciación y muerte celular es característico de los agentes antileucémicos, no solo sobre las células tumorales, sino también sobre las células normales (**Valeri et al., 2010**). Sin embargo y de manera sorprendente, ninguna concentración de CasNa utilizada, alteró la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal en presencia de interleucina-3, y sin evidencias de fragmentación del material genético que sugiriera muerte por apoptosis. Los datos hasta aquí observados concuerdan con la capacidad de algunos derivados de la caseína para inducir proliferación de células progenitoras de sangre humana pero no en células de leucemia mieloide crónica K562, ni de células de cáncer de colon (**Sydeman, 2010**). Pero contrastan con el hecho de que el CasNa inhibe la proliferación la línea celular hematopoyética 32D (**Ramos et al., 2004**), la cual ha sido por muchos años considerada como un modelo de estudios de la hematopoyesis normal *in vitro* (**Aglianó et al., 2000**).

Se reporta en la literatura que moléculas como la antraciclina daunorubicina, es 2.7 veces más tóxica sobre cultivos de células leucémicas que sobre progenitores mielomonocíticos *in vitro* (**Valeri et al., 2010**), el ácido betulínico reduce la actividad metabólica de células leucémicas, pero requiere concentraciones 10 veces más altas para lograr el mismo efecto en los linfocitos humanos normales

(**Faujan et al., 2004**), mientras que la curcumina induce apoptosis en más de 80% de células CD34⁺ de pacientes con AML, la misma concentración es citotóxica sólo en 20% de las células normales (**Rao et al., 2011**), sin embargo ninguna de ellas induce la proliferación de células normales como la hace el CasNa, una propiedad poco frecuente entre la mayoría de los fármacos aprobados para su uso en el tratamiento de AML, por lo que el CasNa supera expectativas de cualquier anticancerígeno en investigación y obliga a estudiar en un futuro los mecanismos celulares y moleculares que expliquen tan exquisito efecto antagónico.

Para conocer más acerca del efecto del Caseinato de sodio sobre células leucémicas, utilizamos como modelo de estudio la línea de leucemia mielomonocítica WEHI-3, la cual desde su desarrollo hace más de tres décadas (**Warner et al., 1969**) y hasta la actualidad, es uno de los modelos en ratón de mayor valor y uso en el estudio de la leucemia mieloide aguda (**Wen et al., 2010; Park et al., 2002; Dilloo et al., 1997; Robinson et al., 1992**) y sobre todo, para el estudio de drogas antileucémicas potenciales (**He & Na, 2001; Gamba-Vitalo et al., 1986; Burgess & Metcalf, 1980; Li & Sartorelli, 1992**).

Bajo nuestras condiciones experimentales observamos que la inoculación intraperitoneal de células WEHI-3, de manera invariable inducía letalidad en los ratones BALB/c, al mismo tiempo que se generaba hepatomegalia, esplenomegalia y tumores sólidos, tal como ha sido descrito previamente (**Chi-Cheng et al., 2012; Valeri et al., 2010; Sharabani et al., 2006**). También en 24 h después de la inoculación se encontraron las células marcadas con fluorescencia en la médula ósea, lo cual confirma que la leucemia no se limita a la cavidad peritoneal y sitio de inyección, tal y como ya ha sido mostrado en otros trabajos (**Gamba-Vitalo et al., 1989; Gidali et al., 2001**), confirmando así que estas

células tienen la capacidad para colonizar sitios secundarios y exhiben una importante naturaleza agresiva ya que llevan a la muerte de todos los animales inoculados con WEHI-3.

Cuando recuperamos células de la médula ósea de ratones inoculados intraperitonealmente o no con células WEHI-3 y las cultivamos en ausencia de interleucina-3, sólo proliferaron aquellas provenientes de ratones leucémicos, resultados que concuerdan con lo reportado por **Gidali et al., 2001** y que parecen justificar que la inoculación intraperitoneal de células leucémicas WEHI-3 en ratones BALB/c, pueda ser referida como leucemia (**Shabtay et al., 2008; García-Castro et al., 2003**) y más comúnmente modelo de leucemia (**Sharabani et al., 2006; Ebata et al., 2006; Koenigsmann et al., 1992**), e incluso de manera indistinta (leucemia y modelo de) en una misma publicación (**Shabtay et al., 2008**).

Seguros de tener un modelo de leucemia en ratón, se pudo observar que la administración de CasNa redujo la carga tumoral, suprimió la hepatomegalia y colectivamente aumentó la supervivencia de ratones leucémicos de modo significativo, parámetros que se consideran como evidencia de la inhibición del crecimiento de células WEHI-3 *in vivo* (**Yoon et al., 2008**).

Aunque es evidente que el CasNa promueve la supervivencia de ratones leucémicos, no se conocen los mecanismos de acción antileucémico de CasNa *in vivo*, no obstante, considerando que cocultivos de células WEHI-3 y CMN presentaron características morfológicas similares a sólo CMN pero no a WEHI-3, el análisis de fragmentación de DNA muestra que existe degradación en un patrón DNA *ladder* en WEHI-3 más CasNa y el cocultivo con CasNa pero no en células hematopoyéticas normales, sugieren que el CasNa puede inducir la muerte de las

células WEHI-3 de manera similar a como lo hace *in vitro* o al menos, inducir su diferenciación y en consecuencia limitar su capacidad leucemogénica.

Asimismo existe la posibilidad de que las propiedades antitumorales descritas aquí, sean resultado de la inducción masiva de la migración de células inflamatorias en la cavidad peritoneal (**Pasotti et al., 1993**), ya sea por la acción de componentes bioactivos de caseína, producto de la digestión de esta molécula por los fagocitos (**Russel et al., 1977**) o de la secreción de factores de crecimiento, diferenciación o inflamatorios que actúan de manera sistémica y no solo en la cavidad peritoneal y que se conoce que son inducidos *in vivo* (**Noursadeghi et al., 2002**). En efecto, nuestro grupo de trabajo recientemente publicó que la inyección intraperitoneal de CasNa activa la hematopoyesis medular y extramedular, induciendo la proliferación del linaje granulocítico y monocítico en medula ósea, incremento en la incorporación de BrdU del linaje linfoide B en bazo y de células T doble positivas en el timo en los tres órganos así como también un incremento en la concentración de citocinas como GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TPO, EPO, IL-2 e IL7 e incluso, aumento en el índice fagocítico en medula ósea tanto de granulocitos como de monocitos (**Domínguez-Melendez et al., 2012**).

Estos hechos son interesantes porque abren la posibilidad de que el CasNa, de manera similar a otros estimuladores no específicos (**Davis, 2000**), tenga la capacidad de eliminar a las células cancerígenas *in vivo* vía la estimulación del sistema inmune innato. Sería interesante analizar si en el contexto del ratón leucémico, el CasNa es capaz de inducir la activación de granulocitos y macrófagos así como la proliferación de células B y linfocitos T, tal como lo hace en el ratón sano. En este sentido, recientemente se mostró que la dantrona, una antraquinona extraída de la planta *Rheum palmatum* L. (Polygonaceae), inhibe el

crecimiento de tumor de células WEHI-3 en vivo al mismo tiempo que aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos y la citotoxicidad de células NK en dichos ratones leucémicos (**Chen et al., 2011**). En efecto, diversas evidencias apoyan la idea de que células efectoras de la respuesta inmune innata, pueden jugar un papel importante en el control de enfermedades como el cáncer (**Shankaran et al., 2001**). Por un lado, se ha mostrado que los macrófagos pueden contribuir tanto a la destrucción de tumores vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos como por medios no específicos de antígenos (**Ralph & Nakoinz, 1981**); hay evidencias de que los neutrófilos son capaces de combatir a células tumorales (**Lin & Pollard, 2004**); se ha sugerido que la respuesta inmune humoral vía anticuerpos y T citotóxicas pueden contribuir en ciertos mecanismos de remisión (**Muller et al., 2004**); y especial atención se ha puesto sobre las células NK pues de manera característica, eliminan a las células tumorales (**Yagita et al., 2004**) mediante la exocitosis de gránulos especializados y la expresión de citocinas (**Hayakawa et al., 2006; Smyth et al., 2006; Al-Tawfiq & Al-khatti, 2007; Kleef et al., 2001**), lo cual coincide con la capacidad del CasNa para inducir la producción de citocinas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Finalmente, es importante resaltar que a pesar que el CasNa prolonga la sobrevivencia y no existen evidencias de enfermedad, persisten células leucémicas en la médula ósea. Sería interesante analizar si, la administración de CasNa en conjunto con un antineoplásico regular como daunorubicina o citarabina, permite ya sea la erradicación de las células leucémicas residuales en la médula ósea o bien, atenuar los efectos tóxicos de la terapia convencional al reducir la concentración terapéutica efectiva del antineoplásico y acelerar la recuperación de las células hematopoyéticas normales de la médula ósea.

CONCLUSIÓN

El caseinato de sodio no es citotóxico para las células hematopoyéticas pero tiene un efecto inductor de la proliferación normal *in vitro*. Por el contrario, en las mismas condiciones, induce apoptosis en células de leucemia WEHI-3. Los cocultivos de células leucémicas WEHI-3 y células normales de médula ósea de ratón BALB/c en presencia de caseinato de sodio, muestran similitudes en proliferación, actividad metabólica y diferenciación respecto a cultivos individuales de células normales pero no de células leucémicas WEHI-3. Estos resultados sugieren que el CasNa conserva la capacidad para bloquear la hematopoyesis leucémica y favorecer la normal, aún en un sistema de cultivo mixto.

El caseinato de sodio, cuando es inoculado a ratones leucémicos, prolonga la supervivencia y atenúa las manifestaciones de la enfermedad, lo cual es una clara evidencia de la actividad antileucémica *in vivo*. Las evidencias descritas aquí sugieren que la sal de sodio de caseína, tiene un espectro muy amplio de actividades biológicas y quizás, mucho más de lo que se ha descrito hasta el momento.

PERSPECTIVAS

- Analizar si la administración de casna en conjunto con un antineoplásico regular como daunorubicina o citarabina:
 - ✓ Permite la erradicación de las células leucémicas residuales en la médula ósea.
 - ✓ Atenúa los efectos tóxicos de la terapia convencional.
 - ✓ Reduce la concentración terapéutica efectiva del antineoplásico.
 - ✓ Acelera la recuperación de las células hematopoyéticas normales de la médula ósea.
- En el contexto del ratón leucémico analizar si el CasNa:
 - ✓ Induce la activación de granulocitos y macrófagos así como la proliferación de células B y linfocitos T, tal como lo hace en el ratón sano.

LITERATURA CITADA

Aglianó A, Santangelo C, Silvestri I, Gazzaniga P, Giuliani L, Naso G, Frati L, Castiglia R. On chromosomal instability: what is the karyotype of your 32D Cl3 cell line. *Blood* 95:3636-3367, 2000.

Alfaro M, García C, Dueñas G. Métodos de detección de la apoptosis; aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nac Cancerol (Mex)* 46:275-280, 2000.

Alharbi R, Pettengell R, Pandha H, Morgan R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* doi: 10.1038/leu.2012.356, 2012.

Al-tawfiq J, Al-khatti A. Spontaneous remission of acute monocytic leukemia after infection with *Clostridium septicum* *Int Jnl Lab Hem* 29:386–389, 2007.

Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Suda T. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann NY Acad. Sci* 1176:36-46, 2009.

Aschkenasy A. Effets compares de la caseine et de divers melanges aminoacides sur la restauration de Lerythopoiese, de la neutropoiese et de la lymphopoiese chez des rats prepares par une privation prolongee de proteines. *Nouvelles etudes. Arch Sci Physiol* 25:415-430 1971.

Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:607-620, 2004.

Beveridge B & Urtasun A. Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos secundarios al tratamiento oncológico. *An Med Interna* 20:257-268, 2003.

Bhatia M, Wang J, Kapp U, Bonnet D, Dick J. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5320-5325, 1997.

Bonnet D. Hematopoietic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 69:219-229, 2003.

Broxmeyer H, Youn B, Kim C, Hangoc G, Cooper S, Mantel C. Chemokine regulation of hematopoiesis and the involvement of pertussis toxin-sensitive G alpha i proteins. *Ann N Y Acad Sci* 938:117-127, 2001.

Burgess A, Metcalf D. Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int J Cancer* 26:647–654, 1980.

Cartwright G. El laboratorio en el diagnóstico hematológico. Científico-medica Barcelona. 55p, 1973.

Cavallo M, Fava D, Monetti L, Barone F, Pozzilli P. Cell mediated immune response to b-casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet* 348:926-928, 1996.

Chen Y, Lu H, Hung F, Huang A, Hsueh S, Liu C, Yang J, Yu C, Chiang J, Lu C, Chiu T, Chung J. Danthron inhibits murine WEHI-3 cells *in vivo*, and enhances macrophage phagocytosis and natural killer cell cytotoxic activity in leukemic mice. *In vivo* 25:393-398 2011.

Chi-Cheng Lu, Jai-Sing Yang, Jo-Hua Chiang, Mann-Jen Hour, Kuei-Li Lin, Jen-Jyh Lin, Wen-Wen Huang, Minoru Tsuzuki, Tsung-Han Lee, and Jing-Gung Chung, Novel Quinazolinone MJ-29 Triggers Endoplasmic Reticulum Stress and Intrinsic Apoptosis in Murine Leukemia WEHI-3 Cells and Inhibits Leukemic Mice *PLoS One* 7:e36831, 2012.

Civin C, Strauss L, Fackler M, Trischmann T, Wiley J, Loken M. Positive stem cell selection basic science. *Prog Clin Biol Res* 333:387-401, 1990.

Clark B, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci* 770:70-78, 1995.

Clark S, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236:1229-1237, 1987.

Coulombel L. Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 43:7210-7220, 2004.

Cross M, Gill H. Immunomodulatory properties of milk. *Br J Nutr* 84:S81-S89, 2000.

Davis I. An overview of cancer immunotherapy *Immunology and Cell Biology* 78:179-195, 2000

Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and Etiology. *Cancer* 107:2099-2107, 2006.

Díaz-Beveridge R, Aparicio Urtasun J. leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos secundarios al tratamiento oncológico. *An Medicine Internal Madrid* 20:257-268, 2003.

Diggs L. La morfología de las células de la sangre. Abbott Laboratories USA. 71pp. 1971.

Diloo D, Brown M, Roskrow M, Zhong W, Holladay M, Holden W, Brenner M. CD40 Ligand Induces an Antileukemia Immune Response *In vivo*. *Blood* 90:1927-1933, 1997.

Dingli D, Pacheco J. Modeling the architecture and dynamics of hematopoiesis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2:235-244, 2010.

Domínguez-Melendez V, Silvestre-Santana O, Moreno-Fierros L, Aguiñiga-Sánchez I, Ledesma-Martínez, Marroquin-Segura R, Garcia-Hernández A.L, Weiss-Steider B, Marche-Cova A, Monroy-García A, Mora-García L, Santiago-Osorio E. Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis. *Inflamm Res* 4:367-373, 2012.

Donahue R, Wang E, Stone D, Kamen R, Wong G, Sehgal P, Nathan D, Clark S. Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature* 321:872-875, 1986.

Douglass T, Driggers L, Zhang J, Hoa N, Delgado C, Williams C, Dan Q, Sanchez R, Jeffes E, Wepsic H, Myers M, Koths K, Jadus M. Macrophage colony stimulating factor: not just for macrophages anymore! A gateway into complex biologies. *Int Immunopharmacol* 8:1354-1376, 2008.

Ebata K, Shimizu Y, Nakayama Y, Minemura M, Murakami J, Kato T, Yasumura S, Takahara T, Sugiyama T, Saito S. Immature NK cells suppress dendritic cell functions during the development of leukemia in a mouse model. *J Immunol* 7:4113-4124, 2006.

Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368:1894–1907, 2006.

Faujan N, Alitheen S, Yeap A, Ali A, Muhajir F, Ahmad H. Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca cajuput* on human myeloid leukemia (HL-60) cell line. *Afr J Biotechnol* 9: 6387-6396, 2010.

Fey 2007. Normal and malignant hematopoiesis *Annals of Oncology* 18 Supplement 1i9–i13, 2007.

Francke A, Herold J, Weinert S, Strasser R, Braun-Dullaeus R. Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *J Histochem Cytochem* 59:813-825 2011.

Gamba-Vitalo C, Blair O, Keyes S, Sartorelli A. Differentiation of WEHI-3B Dp monomyelocytic leukemia cells by retinoic acid and aclacinomycin A. *Cancer Res* 46: 1189–1194, 1986.

Garcia-Castro J, Rio P, Lillo R, Garcia-Sanchez F, Segovia J, Bueren J. Purging of leukemia-contaminated bone marrow grafts using suicide adenoviral vectors: an *in vivo* murine experimental model. *Gene Ther* 10:1328-1335, 2003.

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.

Giles F, Keating A, Goldstone A, Avivi I, Willman C, Kantarjian H. Acute Myeloid Leukemia. *Hematology* 1:73-110, 2002.

Gimenez A. Sarcoma granulocítico o cloroma. *Cancer* 58:2697-2709, 1986.

Glimm H, Eisterer W, Lee K, Cashman J, Holyoake T, Nicolini F, Shultz L, von Kalle C, Eaves C. Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta2 microglobulin-null mice. *J Clin Invest* 107:199-206, 2001.

Goldberg J, McGuire L, Williams W. Myeloid differentiation of human blood mononuclear cells in liquid culture. *Blood* 57:497-504, 1981.

Guimerais-Iglesias V, Guiñon-Gil E, Gabernet G, Belinchón-García M, Osuna-Sánchez M, Casanelles E, Comella X, Yuste V. Apoptotic DNA Degradation into Oligonucleosomal Fragments, but Not Apoptotic Nuclear Morphology, Relies on a Cytosolic Pool of DFF40/CAD Endonuclease. *J Biol Chem* 287:7766-7779, 2012.

Guo M, Hay B. Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 11:745-752, 1999.

Hall C. Drying of milk and products. 2a edition. Ed. The Avi Pub Company Inc USA. 111 pp. 1971.

Hamblin A. Cytokines and cytokine receptors. Ed. IRL Press Oxford University Press, London. 90 pp. 1993.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 7:57-70, 2000.

Hayakawa Y, Nicholas D, Huntington Stephen L, Nutt Mark J, Smyth Functional subsets of mouse natural killer cells *Immunol Rev* 214:47-455, 2006.

He Q, Na X. The effects and mechanisms of a novel 2-aminosteroid on murine WEHI-3B leukemia cells *in vitro* and *in vivo*. *Leuk Res* 25:455-461, 2001.

Hira T, Hara H, Tomita F, Aoyama Y. Casein bind to the cell membrane and induces intracellular calcium signal in the enteroendocrine cell: a brief communication. *Exp Biol Med* 228: 850, 2003.

Huerta S, Goulet E, Huerta-Yépez S, Livingston E. Screening and Detection of Apoptosis. *J Surg Res*. 139:143-156, 2007.

Hughes-Jones N, Wickramasinghe E. Lecture notes on haematology. Ed. Blackwell Scientific Publications, London. 225 pp, 1991.

Jacobsen S, Ruscetti F, Ortiz M, Gooya J, Keller J. The growth response of Lin-Thy-1+ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy of multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. *Exp Hematol* 22:985, 1994.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics 2010. *CA Cancer J Clin* 60:277-300, 2010.

Jinsmaa Y, Yoshikawa M. Enzymatic release of neocasomorphin and beta-casomorphin from bovine beta-casein. *Peptides* 20:957-962, 1999.

Kayser H, Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett* 382:18-20, 1996.

Kleef R, Jonas W, Knogler W, Stenzinger W. Fever, cancer incidence and spontaneous remissions. *Neuroimmunomodulation* 9:55-64, 2001.

Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* 51:914-926, 1995.

Koenigsmann M, Zafferani M, Danhauser-Riedl S, Reufi B, Houlihan WJ, Thiel E, Berdel WE. Lack of therapeutic effects of platelet activating factor antagonists in WEHI-3B leukemia, human xenotransplanted colorectal and lung cancer and Lewis-lung tumor *in vivo*. *Cancer Lett* 67:145-56, 1992.

Koletzko B, Agget P, Bindels J, Bong P, Ferre P, Gil A, Lentze M, Robertfroid M, Strobel S. Growth development and differentiation: a functional food science approach. *British J Nutrition* 80:S5-S45-, 1998.

Kroemer G, El-Deiry W, Golstein P, Peter M, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny M, Malorni W, Knight R, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12:1463-1467, 2005.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, El-Deiry W, Golstein P, Green D, Hengartner M, Knight R, Lipton S, Malorni W, Nuñez G, Peter M, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky V, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ* 16: 3-11, 2009.

Lagunez S. Estimulación de la hematopoyesis medular y extramedular inducida por el caseinato de sodio (CasNa) en ratones BALB/c. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM, 2004.

Laubach J, Rao A. Current and emerging strategies for the management of acute myeloid leukemia in the elderly. *Oncologist* 13:1097-1108, 2008.

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 apoptosis of WEHI-3 leukaemic cells and increased survival in leukaemic mouse. *Oncology Letters* 4:461-466, 2012.

Lewis S, Van Epss D. Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation* 7:363-375, 1983.

Li J, Sartorelli A. Synergistic induction of the differentiation of WEHI-3B Dp myelomonocytic leukemia cells by retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Leuk Res* 16:571–576, 1992.

Lickliter J, Wood N, Johnson L, McHugh G, Tan J, Wood F, Cox J and Wickham N. HA141 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death. *Leukemia* 17: 2074-2080, 2003.

Liebermann D, Hoffman-Liebermann B. Proto-oncogene expression and dissection of the myeloid growth to differentiation developmental cascade. *Oncogene* 4:583-592, 1989.

Lin E, Pollard W. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 90:2053–2058, 2004.

Lotem, J, Sachs L. Control of *in vivo* differentiation of myeloid leukaemic cells. III. Regulation by T lymphocytes and inflammation. *Int J Cancer* 32:781-791, 1983.

McDonald G, Paul J, Cruickshank H. Atlas de hematología. Madrid-MéxicoPanamericana. 201pp, 1998.

Metcalf D, Robb L, Dunn A, Mifsud, S, DiRago 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.

Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 111:485–491, 2008.

Montesinos J, Mayani H. New concepts in the biology of acute myeloid leukemia. *Gac Med Mex* 138:67-76, 2002.

Muller C, Trepel M, Kunzmann R, Lais A, Engelhardt R, Lbbert M. Hematologic and molecular spontaneous remission following sepsis in acute monoblastic leukemia with translocation (9;11): a case report and review of the Literature. *Eur J Haematol* 73:62–66, 2004.

Munker R, Hiller E, Paquette R. Modern hematology. Biology and clinical management. Ed. Human Press, New Jersey. 369 pp, 1998.

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

Okano M, Ohnata H, Sasaki R. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursors cells. *J Nutr* 122:1376-1383, 1992.

Orkin S. Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270:4955-4058, 1995.

Park W, Lee M, Park K, Kim E, Kim B, Lee Y. Monensin-mediated growth inhibition in acute myelogenous leukemia cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Cancer* 101:235-242, 2002.

Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Friego G. The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 2:71-81, 1993.

Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock H. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74:2527-2534, 1989.

Pessi T, Isolauri E, Sütas Y, Kankaanranta H, Moilanen E, Hurme M. Suppression of T-cell activation by *Lactobacillus rhamnosus* GG-degraded bovine casein. *Int Immunopharmacol* 1:211-218, 2001.

Ralph P, Nakoinz I. Differences in antibody-dependent cellular cytotoxicity and activated killing of tumor cells by macrophage cell lines. *Cancer Res* 41:3546-3550, 1981.

Ramirez-Ortega M, Maldonado-Lagunas V, Melendez-Zajgla J, Carrillo-Hernandez J, Pastelin-Hernandez G, Picazo-Picazo O, Ceballos-Reyes G. Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by *in vitro* stimulation with digitalis. *Eur J Pharmacol* 534:71-76, 2006.

Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. Sodium caseinate induces differentiation of 32D pluripotential hematopoietic cells. *Rev Invest Clin* 52:638-644, 2000.

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. *Arch Med Res* 35:109-113, 2004.

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, 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* 213:133-141, 2008.

Rao J, Xu D, Zheng F, Long Z, Huang S, Wu X, Zhou W, Huang R, Liu Q. Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells. *J Trans Med* 9:71-86, 2011.

Read L, Lord A, Brantl V, Koch G. Absorption of beta-casomorphins from autoperfused lamb and piglet small intestine. *Am J Physiol* 259:443-452, 1990.

Robak T, Wierzbowska A. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clin Ther* 31:2349-2370, 2009.

Robinson S, Rose W. Transforming growth factor beta 1: lack of *in vivo* antitumor activity on A549 and Wehi 3BD+ tumors. *Anticancer Res* 12:73-79, 1992.

Roboz G. Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011:43-50, 2011.

Rowe J. Innovative approaches in the treatment and support of patients with acute myelogenous leukemia. *Oncologist* 12 Suppl 2:1, 2007.

Ruiz-Argüelles G, Gómez-Almaguer D, Ruiz-Delgado G, Tarín-Arzaga L. Ocho años de experiencia con el "Método Mexicano" en la realización de trasplantes de células hematopoyéticas alogénicas. *Gac Méd Méx* 143:231-235, 2007.

Russell M, Brooker B, Reiter B. Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leucocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk. *J Comp Pathol* 87:43-52, 1977.

Salazar M. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista colombiana de biotecnología* 11:152-166, 2009.

Sans-Sabrafen J, Besses R. *Hematología clínica*. 5ª edición, editorial Elsevier España, 2006.

Santiago-Osorio E, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Martínez I, Ramos-Mandujano G, *et al.* Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology* 215:332-339, 2010.

Shabtay A, Sharabani H, Barvish Z, Kafka M, Amichay D, Levy J, Sharoni Y, Uskokovic M, Studzinski G, Danilenko M. Synergistic antileukemic activity of carnosic acid-rich rosemary extract and the 19-nor Gemini vitamin D analogue in a mouse model of systemic acute myeloid leukemia. *Oncology* 75:203-214, 2008.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce A, White M, Swanson P, Old L, Schreiber R. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111, 2001.

Sharabani H, Izumchenko E, Wang Q, Kreinin R, Steiner M, Barvish Z, Kafka M, Sharoni Y, Levy J, Uskokovic M, Studzinski G, Danilenko M. Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. *Int J Cancer* 118:3012-3121, 2006.

Shcheblyakov D, Logunov D, Rakovskaya I, Shmarov M, Naroditsky B, Ginzburg A. Triggering of Toll-like Receptor-2 in Mouse Myelomonocytic Leukaemia Cells WEHI-3B Leads to the Suppression of Apoptosis and Promotes Tumor Progression *in vivo*. *Acta Naturae* 4:83-93, 2011.

Shipley J, Butera J. Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 37:649-658, 2009.

Shu X, Linet M, Steinbuch M, Wen W, Buckley J, Neglia J. Breast-feeding and risk of childhood acute leukemia. *J Natl Cancer Inst* 91:1765-1772, 1999.

Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 10:9-16, 2003.

Smith M, Ries L, Gurney J. Leukemia. In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, *et al*, editors. *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975–1995*. NIH Pub. No. 99–4649. Bethesda (MD): National Cancer Institute, SEER program; p. 17–34, 1999.

Smyth M, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon J, van den Brink M, Yagita H. Nature's TRAIL on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 18:1–6, 2003.

Stanovi'c S, Borani'c M. Neuropeptides, endogenous opioid peptides and cell proliferation. *Lijec Vjesn* 121:82-87, 1996.

Stone R, O'Donnell M, Sekeres M. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 98-117, 2004.

Sydelman Z. Casein derived peptides and uses thereof in therapy. patente US 7,741,274, 2010.

Tallman M, Gilliland D, Rowe J. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 106:1154-1163, 2005.

Tang H, Yuen K, Tang H, Fung M. Reversibility of apoptosis in cancer cells. *British Journal of Cancer* 20:118–122, 2009.

Taylor R, Cullen S, Martin S. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 231-241, 2008.

Valeri A, Alonso-Ferrero M, Cerrato L, Martínez S, Bueren J, Albella B. Development of an *in vitro* model for the simultaneous study of the efficacy and hematotoxicity of antileukemic compounds. *Toxicol Lett* 15:317-22, 2010.

Vardiman J, Harris N, Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 7:2292-2302, 2002.

Vardiman J. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact* 184:16-20, 2010.

Verfaillie C, Catanzarro M, Li N. Macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin 3 and diffusible marrow stromal factors maintain human hematopoietic stem cells for at least eight weeks *in vitro*. *J Exp Med* 179: 643-649, 1994.

Walstra P, Jenners R. Dairy chemistry and physics. Ed. Jhon Wiley Sons, New York, USA. 106 pp, 1984.

Warner J. Principios de la tecnología de lácteos. Ed. AGT editor. México. 256 pp. 1976.

Warner N, Moore M, Metcalf D. A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *J Natl Cancer Inst* 43:963–982, 1969.

Wen Y, Yang J, Kuo S, Hwang C, Chung J, Wu H, Huang W, Jhan J, Lin C, Chen H. Investigation of anti-leukemia molecular mechanism of ITR-284, a carboxamide analog, in leukemia cells and its effects in WEHI-3 leukemia mice. *Biochem Pharmacol* 79:389-398, 2010.

Wong C, Seow H, Liu A, Hunsband A, Smithers G. Modulation of immune responses by bovine b-casein. *Immunol Cel Biol* 74:323-329, 1996.

Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Okumura K. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 95:777–783, 2004.

Yoon J, Kim J, Park H, Kim E, Ahn K, Yoon S, Cho C, Kim B, Lee Y. Antileukemic effect of a synthetic vitamin D3 analog, HY-11, with low potential to cause hypercalcemia. *Int J Oncol* 32:387-396, 2008.

Ziegler-Heitbrock H, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 23:2053–2058, 1993.

Casein induces the proliferation of bone marrow mononuclear cells, apoptosis of WEHI-3 leukaemic cells and increased survival in a leukaemia mouse model

E. LEDESMA-MARTÍNEZ¹, C. PÉREZ-CORDERO¹, Y. CÓRDOVA-GALAVIZ¹, G. SÁNCHEZ-TELLEZ¹, S. HUERTA-YEPEZ², I. AGUIÑIGA-SÁNCHEZ¹, E. MIRANDA-PERALTA³, A. MONROY-GARCÍA^{4,5}, B. WEISS-STEIDER¹ and E. SANTIAGO-OSORIO¹

¹Hematopoiesis and Leukaemia Laboratory, Research Unit on Cell Differentiation and Cancer, National Autonomous University of Mexico; ²Research Unit in Oncological Diseases, Childhood Hospital of Mexico "Federico Gómez"; ³Cancer Research Unit, Oncology Hospital; ⁴Immunology and Cancer Laboratory, Medical Research Unit on Oncological Diseases, Mexican Social Security Institute (IMSS); ⁵Immunobiology Laboratory, Research Unit on Cell Differentiation and Cancer, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

Received January 16, 2012; Accepted April 10, 2012

DOI: 10.3892/ol.2012.758

Abstract. Acute myeloid leukaemia results from the neoplastic transformation of haematopoietic stem cells. Although advances have been made in its treatment, the mortality rate remains high. As a result, therapeutic alternatives continue to be explored. In this study, we present evidence that suggests that casein, the principal protein in milk, possesses significant antileukaemic properties. We investigated whether casein inhibited the *in vitro* proliferation and induced the apoptosis of the mouse myelomonocytic leukaemia cell line WEHI-3. By contrast, under identical conditions, casein markedly promotes the proliferation of mouse normal mononuclear bone marrow cells. Since the selective elimination of leukaemia cells is an ideal therapeutic strategy, we also evaluated the antileukaemic potential of casein *in vivo*. The results showed that casein increases the survival of mice bearing WEHI-3-induced tumours, suggesting that this molecule is also capable of inhibiting the proliferation of these cells *in vivo*. The evidence that casein inhibited cell proliferation and induced apoptosis in leukaemia cells *in vitro*, but increased survival *in vivo* in a

leukaemia mouse model, indicates that casein may be useful in leukaemia therapy.

Introduction

Acute myeloid leukaemia is a neoplastic disease of blood stem cells that is characterised by the continuous clonal proliferation of myeloid precursors in the absence of differentiation or maturation into terminal cells (1). In spite of advances in leukaemia treatment, survival rates remain low, with 5-year survival rates of 60 and 10% in young and elderly patients, respectively (2). Thus, several new strategies are currently being developed (3).

Casein is the principal protein in milk and a significant component of the human diet that also regulates the proliferation and activation of blood cells. For example, β -casein, a component of bovine casein, has been found to activate free radical production in granulocytes and to induce lymphocyte proliferation (4). Casein also acts as an inflammatory agent that induces the migration of myeloid and lymphoid cells into the peritoneal cavity (5). In a previous study, we showed that casein inhibits the proliferation of the normal mouse myeloid cell line 32D by inducing its differentiation into the monocyte-macrophage lineage (6). Additionally, casein has been shown to inhibit the proliferation of several leukaemia cell lines (7).

An ideal therapeutic agent is one that selectively targets and kills cancer cells with minimal toxicity to normal tissues (8) and there are naturally occurring molecules that fulfill this requirement (9). As casein is able to induce the differentiation of the 32D cell line and inhibit leukaemia cells, the current study was performed to determine whether casein is capable of inducing the apoptosis of WEHI-3 and mononuclear bone marrow cells *in vitro* and inducing antileukaemic effects *in vivo*. The results of this study indicate that casein induces the apoptosis of leukaemia cells without exerting a cytotoxic

Correspondence to: Dr Edelmiro Santiago-Osorio, Hematopoiesis and Leukaemia Laboratory (L-8), Research Unit on Cell Differentiation and Cancer, UMEZ, FES-Zaragoza Campus II, National Autonomous University of Mexico, Batalla 5 de mayo s/n, Col. E. Oriente, Esquina Fuerte de Loreto, Iztapalapa, CP 09230, Mexico City, Mexico
E-mail: edelmiro@unam.mx

Key words: sodium caseinate, BALB/c, acute myeloid leukaemia, cell line, leukaemia model

effect on normal haematopoietic cells, thereby prolonging the survival of leukaemic mice.

Materials and methods

Experimental animals. BALB/c female mice between 8 and 12 weeks of age were used and maintained in pathogen-free conditions. Experiments were carried out in the animal facility of Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, in accordance with institutional guidelines. Mice were provided with autoclaved water and fed a standard powdered rodent diet *ad libitum*. All experimental protocols were approved by the ethics committee of our institution in accordance with national and international regulations for the care and use of experimental animals.

Cell culture. The WEHI-3 murine myelomonocytic leukaemia cell line was obtained from ATCC (Rockville, MD, USA). The cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C and the culture medium was changed every 2 days.

Total bone marrow cells of the mice were obtained from the femur and flushed with IMDM supplemented with 10% FBS. Mononuclear cells (MNCs) were obtained from the total cells via gradient separation with Ficoll-Paque (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) at a density of 1.077 g/ml and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). MNCs were cultured for 120 h in IMDM supplemented with 15% (v/v) FBS, 5% (v/v) horse serum (Gibco-BRL) and 5 ng/ml recombinant mouse interleukin-3 (rmIL-3) (R&D System, Minneapolis, MN, USA). The cells were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C and were maintained in culture for a maximum period of 120 h.

Casein. Sodium caseinate, used as source of casein, (Spectrum, New Brunswick, NJ, USA) was dissolved in PBS at a concentration of 100 mg/ml. Autoclaved dilutions were made with PBS to achieve concentrations of 0.5, 1 and 2 mg/ml.

Proliferation assay. To evaluate cell proliferation, 3x10⁵ and 750 WEHI-3 cells and 1x10⁵ MNCs/ml were cultured for either 72 or 120 h with rmIL-3 and a range of casein concentrations (0, 0.5, 1 or 2 mg/ml) in 24-well plates (Corning Costar, St. Louis, MO, USA). The cultures were then fixed with 1.1% glutaraldehyde and stained with crystal violet in 0.1% formic acid (Sigma-Aldrich). The dye was solubilised in 10% acetic acid and the optical density at 570 nm was determined using a plate reader (Tecan Spectra, Grödig, Austria).

Cell viability. Trypan blue exclusion assays were used to determine the number of viable cells in each culture. The cells were incubated in the presence or absence of 2 mg/ml of casein for 120 h. Cell viability was determined by direct counting in a Neubauer chamber; cells excluding the stain were counted as viable. The results were shown as the mean percentage of cell viability ± standard deviation (SD) of triplicate cultures.

Cell metabolic activity was quantified using the CellTiter 96® aqueous non-radioactive cell proliferation (MTT) assay (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, following 120 h in the presence or absence of 2 mg/ml casein, 20 µl of CellTiter 96 Aqueous One solution reagent was added to the plate, which was incubated for 4 h. The absorbance at 490 nm was determined using a plate reader (Tecan Spectra).

Assessment of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis. WEHI-3 or MNCs cells (1x10⁶) were lysed in DNA lysis buffer (1% NPO₄, 20 nM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.9) at 47°C for 15 min. The lysate was then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 47°C. The supernatant containing the fragmented DNA was collected and incubated with 1% sodium dodecyl sulphate (SDS) and 2.5 µg/ml proteinase K, followed by RNaseA-mediated RNA digestion at 37°C for 30 min. Following extraction with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), the DNA was precipitated in 50% isopropanol at -20°C overnight. The precipitated DNA was centrifuged at 14,000 rpm for 30 min, dried and dissolved in TE (pH 8.0) buffer. Following electrophoresis in a 1% agarose gel containing ethidium bromide in TAE buffer, the DNA bands were observed with UV light.

Establishment of the mouse leukaemia model. WEHI-3 cells were washed twice with PBS, counted with trypan blue to confirm >95% viability and adjusted to 2.5x10⁴ cells/ml. BALB/c mice were injected intraperitoneally (i.p.) with WEHI-3 cells and monitored for survival. The mice and their spleens, livers and tumour samples were obtained and weighed individually upon mortality or at the end of the 40 day period; respective indices were determined as the ratio of tumour or organ weight to body weight.

Electroporation procedure. The presence of leukaemia cells in the bone marrow was determined by the fluorescence microscopy of WEHI-3 cells electroporated with the pEGFP-C1 vector (Clontech, Mountain View, CA, USA). For the electroporation experiments, growing cell cultures at 60% confluence were collected and washed in room temperature IMDM-GlutaMAX-1 (Gibco-BRL). Pre-chilled hypoosmolar electroporation medium (0.8 ml) was added to the cell pellets (5x10⁶ cells/ml) either with or without 5 µg of pEGFP-C1 vector and the cells were electroporated at 250 V following a 5 min pre-incubation in the medium. Eight minutes after pulsing, the cells were gently transferred to 4 ml of IMDM-GlutaMAX-1 supplemented with 10% FBS at 37°C and maintained at 5% CO₂. The total time of cell exposure to the electroporation medium did not exceed 17 min. The centrifuged cells were electroporated with a multiporator (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) in disposable sterile electroporation cuvettes (0.8 ml) with a 4-mm gap between embedded aluminium electrodes (Eppendorf AG).

Antileukaemic activity in BALB/c mice. Four groups of 10 BALB/c mice were used. One group of mice was injected i.p. with 1 ml of WEHI-3 cells. Another group was inoculated with WEHI-3 cells, with 10% casein in 1 ml PBS added after 48 h, and again every 48 h, for 35 days. The third and fourth groups were inoculated with 1 ml of PBS or casein, maintained

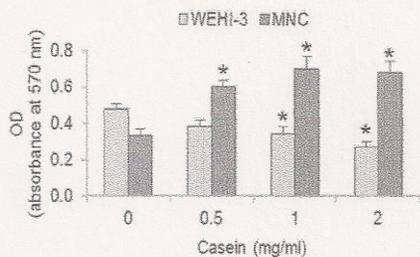


Figure 1. Proliferation of WEHI-3 leukaemia cells and normal bone marrow MNCs of BALB/c mice in the presence of 5 ng/ml rmIL-3 with different concentrations of casein. Each value is the mean \pm standard deviation of at least 3 independent assays. *P<0.05. OD, optical density; rmIL-3, recombinant mouse interleukin-3; MNC, mononuclear cell.

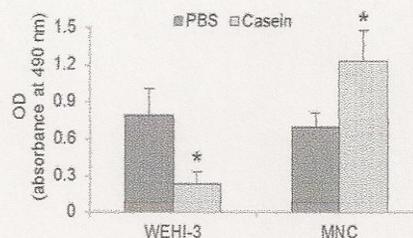


Figure 3. Viability assessed as metabolic activity of WEHI-3 cells and normal bone marrow MNCs of BALB/c mice in the presence of 5 ng/ml rmIL-3 plus 2 mg/ml of casein. Each value is the mean \pm standard deviation of a representative test with 4 replicates per condition. *P<0.05. OD, optical density; PBS, phosphate-buffered saline; rmIL-3, recombinant mouse interleukin-3; MNC, mononuclear cell.

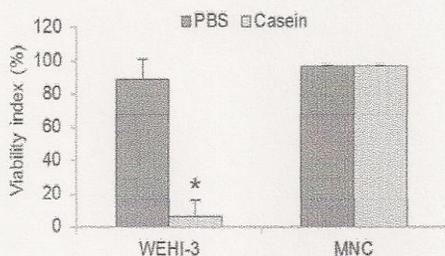


Figure 2. Viability of WEHI-3 cells and normal bone marrow MNCs of BALB/c mice in the presence of 5 ng/ml rmIL-3 with or without 2 mg/ml casein. Each value is the mean \pm standard deviation of at least 3 independent assays. *P<0.05. rmIL-3, recombinant mouse interleukin-3; MNC, mononuclear cell; PBS, phosphate-buffered saline.

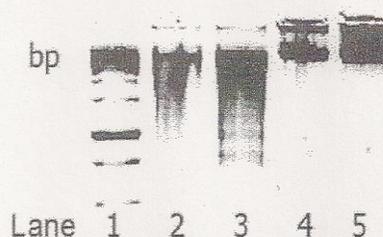


Figure 4. DNA fragmentation, detected via agarose gel electrophoresis, in WEHI-3 or MNC cultures in the presence of 5 ng/ml rmIL-3. Lane 1, marker (bp); lane 2, WEHI-3 plus PBS; lane 3, WEHI-3 plus 2 mg/ml casein; lane 4, MNC plus PBS; lane 5, MNC plus 2 mg/ml casein. Results are representative of 2 separate experiments. bp, base pairs; MNC, mononuclear cell; PBS, phosphate-buffered saline.

as controls and observed for survival during the 40 day time course. At 3 weeks from the start of treatment, the mice were sacrificed and tissues were weighed individually.

Statistical analysis. Individual experiments were carried out in triplicate. The experiments were repeated three times and values were shown graphically as the mean \pm SD. One-way ANOVA was used for statistical analysis. P<0.05 was considered to indicate a statistically significant result. Statistical software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used to perform the analyses.

Results

Casein inhibits the proliferation of WEHI-3 cells and induces the proliferation of bone marrow MNCs. To homologise the culture conditions of the WEHI-3 cells and MNCs, we cultured 750 and 1×10^5 cells/ml, respectively, with 5 ng/ml of rmIL-3 for 120 h in the presence or absence of 0.5, 1 or 2 mg/ml casein. Using crystal violet, we evaluated the number of cells present. The number of WEHI-3 cells were decreased and the number of MNCs were increased as a function of casein concentration (Fig. 1). At 2 mg/ml casein, the inhibition of the WEHI-3 cells was >40%, while the induced proliferation of the MNCs was >50% compared with the control.

Casein reduced metabolic activity and induced cell death in WEHI-3 cells, but did not impair the viability of MNCs. Following the observation that casein inhibited the proliferation of WEHI-3 cells and induced the proliferation of MNCs, we evaluated the viability of those cells when cultured in the presence of 2 mg/ml casein. Results of the trypan blue exclusion assay revealed that the viability was <90% in the WEHI-3 cells but was not reduced in the MNCs (Fig. 2). To evaluate the status of the two cell types, we performed the MTT assay to determine their metabolic activities. In response to the casein treatment, we observed that WEHI-3 cells exhibited a 75% reduction in activity, while MNCs showed an increase of their baseline rate by 50% relative to the control (Fig. 3). The near-complete loss of viability of WEHI-3 cells and the existence of significant metabolic activity, indicated that cell death may have resulted from an active cell mechanism.

Casein induced DNA fragmentation in WEHI-3 cells but not in MNCs. To evaluate whether the casein-induced death in the WEHI-3 cells resulted from an apoptotic mechanism, we examined the fragmentation of DNA in those cells following a 120-h incubation with 2 mg/ml casein. Our results showed that, for the WEHI-3 cells, casein induced the typical apop-

Table I. Treatment of control or leukaemic mice with and without casein treatment.

Index	PBS-1		WEHI-3	
	PBS-2	Casein	PBS-2	Casein
Hepatic	0.066±0.019	0.046±0.005	0.127±0.048 ^a	0.081±0.032 ^a
Splenic	0.004±0.0003	0.002±0.004	0.008±0.002 ^a	0.006±0.001 ^a
Tumoural	ND	ND	0.107±0.093 ^a	0.035±0.002 ^a

BALB/c mice were inoculated *i.p.* with 2.5×10^5 WEHI-3 leukaemia cells or PBS as a vehicle (WEHI-3 or PBS-1, respectively) and sacrificed for examination of necropsy 3 weeks after the start of treatment with 10% casein or vehicle alone (Casein or PBS-2, respectively). Each animal was weighed individually prior to autopsy. The mice spleens, livers and tumour samples were then obtained and weighed individually. Each value is the mean \pm standard deviation of 3 autopsies. ^a $P < 0.05$. ND, not determined; *i.p.*, intraperitoneally; PBS, phosphate-buffered saline.

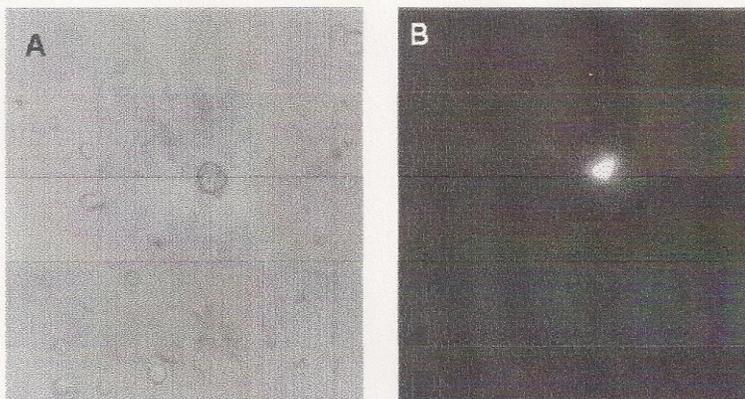


Figure 5. WEHI-3/GFP⁺ cell infiltration in the bone marrow of BALB/c mice, 24 h after intraperitoneal inoculation. (A) Phase contrast. (B) UV. Representative images at x40 magnification.

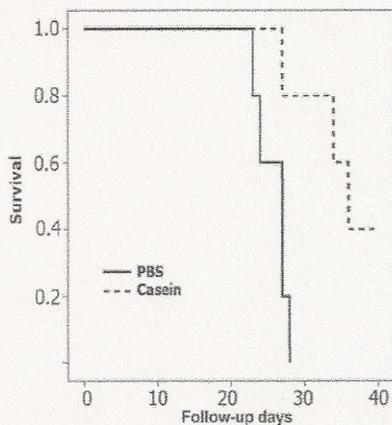


Figure 6. Survival of BALB/c leukaemic mice treated with 1 ml of vehicle (WEHI-3/PBS) or 10% casein in PBS w/v (WEHI-3/Casein) every 48 h. Healthy mice treated only with casein (Casein) were included as a control. Kaplan-Meier curve. $n=10$ per group. PBS, phosphate-buffered saline.

otic stair pattern in the agarose gels; by contrast, this pattern was not observed for the MNCs (Fig. 4). Therefore, our results suggest that casein not only inhibits the proliferation, but also induces the apoptosis, of WEHI-3 cells.

Establishment of a BALB/c-WEHI-3 leukaemia model.

Following the observation that casein was toxic to leukaemia cells but promoted normal myeloid proliferation, we developed a mouse leukaemia model to evaluate the antileukaemic potential of casein. Our results showed that animals challenged with WEHI-3 cells developed marked splenomegaly and hepatomegaly and solid tumours (Table I), resulting in the death of all experimental subjects within 30 days.

WEHI-3 cells infiltrated the bone marrow of mice inoculated

i.p. at 24 h. We determined whether WEHI-3 cells were able to migrate out of the peritoneal cavity during the 48 h prior to treatment with casein in our mouse leukaemia model. Therefore, we evaluated the simultaneous injection of cells transiently transfected with the pEGFP-1 vector to determine whether WEHI-3 cells were present in the bone marrow 24 h after inoculation. Our results showed that WEHI-3 cells

migrated to the bone marrow within one day of i.p. inoculation (Fig. 5).

Casein reduced hepatomegaly and tumour burden and increased the survival of mice inoculated with WEHI-3 cells. Leukaemia was induced by WEHI-3 cells as described above and our results showed that treatment with casein markedly reduced hepatomegaly and the presence of solid tumours (Table I). Conversely, we observed that animals not treated with casein died by day 28, while those treated with casein survived for longer, having a 40% survival rate after 40 days (Fig. 6). Together with the increased survival of mice treated with casein, the decreased liver and tumour indices indicate that casein inhibited the proliferation and induced the apoptosis of WEHI-3 cells.

Discussion

Leukaemia cells undergo physiological alterations that contribute to their self-sufficiency for survival, unlimited growth capacity, apoptosis avoidance mechanisms and arrest of cell differentiation, all of which collectively characterise their malignant nature (10,11). Drugs including anthracyclines and cytarabine are usually used to treat leukaemia, but survival rates are low, with a 60% 5-year survival rate in young patients and a 10% survival rate for elderly patients (2). Given the side effects and poor tolerance by elderly patients of these treatments (12), there is a pressing need for new therapeutic alternatives (13).

We previously reported that casein inhibited the proliferation of the myelomonocytic cell line WEHI-3 (7). In the present study, we have provided evidence that casein also induces apoptosis in WEHI-3 cells. Casein is known to induce the differentiation of the normal mouse myeloid cell line 32D into a monocyte-macrophage lineage (6), thus we expected a similar response in MNCs. However, casein induced a marked proliferation stimulus. These data are significant since the usefulness of a potential anticancer compound depends not only on its cytotoxicity towards malignant cells, but also on a relative lack of toxicity in normal tissues (8). There is evidence to show that normal tissues may be less sensitive to the biological effects of new molecules with potential antileukaemic properties. It has previously been shown that betulinic acid reduces the metabolic activity of WEHI-3 cells, but requires concentrations 10 times higher to achieve the same effect in normal human lymphocytes (14). Curcumin induces apoptosis in more than 80% of CD34⁺ cells from patients with AML, but the same concentration is cytotoxic in only 20% of normal cells (9).

Similar to a number of agents studied thus far (15), casein inhibits proliferation and induces the death of leukaemia cells. However, in addition to exerting no cytotoxicity on non-leukaemia MNCs, casein induces their proliferation, which is a rare property among the majority of drugs tested for use in the treatment of acute myeloid leukaemia. Therefore, we evaluated the possibility of using casein as an antileukaemic agent *in vivo*.

The i.p. inoculation of leukaemia WEHI-3 cells in BALB/c mice has been described as an ideal model for the study of novel therapeutics (e.g., ATRA, aclacinomycin A, IL-6, G-CSF and vitamin D3) (16). To determine whether the leukaemia was restricted to the peritoneal cavity, we evaluated whether i.p.-inoculated WEHI-3 cells were able to migrate to the bone

marrow. We observed that WEHI-3 cells were present in the marrow of inoculated mice as early as 24 h post-inoculation, demonstrating the ability of these cells to colonise secondary sites. This observation demonstrates their aggressive nature, which resulted in the mortality of all animals tested within 30 days.

When casein was injected i.p., it reduced the tumour burden and suppressed hepatomegaly, which collectively increased the survival of the leukaemic mice by a significant extent; this was considered to be evidence of the inhibition of the growth of WEHI-3 cells *in vivo* (17). Therefore, casein exhibits antileukaemic properties *in vitro* and *in vivo*, which is in contrast to the antibody gemtuzumab ozogamicin, which efficiently eliminates leukaemia CD33⁺ cells *in vitro* but does not improve the survival of leukaemic individuals (18).

Whether the antitumour properties exhibited in our leukaemia mouse model resulted from the large induction of inflammatory cell migration to the peritoneal cavity or from the secretion of inflammatory differentiation or growth factors known to be induced *in vivo* is unclear (19). Alternatively, it is possible that these effects resulted from the bioactive components of casein, products of the phagocyte-mediated digestion of casein (20) or a combination of these factors. Due to its size, casein does not enter the bloodstream, but several of its components do. Furthermore, biopeptide derivatives of casein have been detected in blood plasma for several hours following the ingestion of milk (21).

In conclusion, casein is not cytotoxic to normal cells but has an inductive effect of haematopoiesis *in vitro*. Conversely, under the same conditions, casein induces apoptosis in leukaemia cells and prolongs the survival of leukaemic mice, which is clear evidence of antileukaemic activity.

Acknowledgements

We would like to thank Mr. Ernesto J. Rivera Rosales for the excellent technical assistance. We are indebted to CONACYT for a Ph.D. scholarship to LME (48959); CGY (169059); a Master scholarship to ASI (247169); and an undergraduate scholarship to PCC (15750). This study was supported in part by Fondo SEP-CONACYT (grant 104025) and PAPIIT (grant IN225610). Professor Ledesma-Martínez acknowledges the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM) for the training received during the studies.

References

- Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y and Tse W: Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol* 2: 23-33, 2009.
- Robak T and Wierzbowska A: Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clin Ther* 31: 2349-2370, 2009.
- Kuendgen A and Germing U: Emerging treatment strategies for acute myeloid leukemia (AML) in the elderly. *Cancer Treat Rev* 35: 97-120, 2009.
- Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW and Watson DL: Modulation of immune responses by bovine beta-casein. *Immunol Cell Biol* 74: 323-329, 1996.
- Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S and 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* 88: 3755-3764, 1996.

6. Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B and Weiss B: Sodium caseinate induces differentiation of 32D pluripotential hematopoietic cells. *Rev Invest Clin* 52: 638-644, 2000.
7. Ramos-Mandujano G, Weiss-Steider B, Melo B, Cordova Y, Ledesma-Martinez E, Bustos S, Silvestre O, Aguiniga I, Sosa N, Martínez I, *et al.*: 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: 133-141, 2008.
8. Lickliter JD, Wood NJ, Johnson L, McHugh G, Tan J, Wood F, Cox J and Wickham NW: HA14-1 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death. *Leukemia* 17: 2074-2080, 2003.
9. Rao J, Xu DR, Zheng FM, Long ZJ, Huang SS, Wu X, Zhou WH, Huang RW and Liu Q: Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34⁺ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34⁺ acute myeloid leukemia cells. *J Trans Med* 9: 71-86, 2011.
10. Hanahan D and Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 7: 57-70, 2000.
11. Montesinos JJ and Mayani H: New concepts in the biology of acute myeloid leukemia. *Gac Med Mex* 138: 67-76, 2002 (In Spanish).
12. Tallman MS, Gilliland DG and Rowe JM: Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 106: 1154-1163, 2005.
13. Roboz GJ: Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 43-50, 2011.
14. Faujan NB, Alitheen SK, Yeap AM, Ali AH, Muhajir FB and Ahmad H: Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from *Melaleuca cajuput* on human myeloid leukemia (HL-60) cell line. *Afr J Biotechnol* 9: 6387-6396, 2010.
15. Shipley J and Butera J: Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 37: 649-658, 2009.
16. He Q and Na X: The effects and mechanisms of a novel 2 aminosteroid on murine WEHI3B leukemia cells in vitro and in vivo. *Leuk Res* 25: 455-461, 2001.
17. Yoon JS, Kim JY, Park HK, Kim ES, Ahn KS, Yoon SS, Cho CG, Kim BK and Lee YY: Antileukemic effect of a synthetic vitamin D3 analog, HY-11, with low potential to cause hypercalcemia. *Int J Oncol* 32: 387-396, 2008.
18. Majeti R: Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene* 30: 1009-1019, 2010.
19. Noursadeghi M, Bickerstaff MCM, Herbert J, Moyes D, Cohen J and Pepys MB: Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J Immunol* 169: 913-919, 2002.
20. Russell MW, Brooker BE, and Reiter B: Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leucocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk. *J Comp Pathol* 87: 43-52, 1977.
21. Chabance B, Marteau P, Rambaud J, Migliore D, Boynard M, Perrotin P, Jollès P and Fiat AM: Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80: 155-165, 1998.