



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

**EFFECTO IN VITRO E IN VIVO DEL CASEINATO DE SODIO (CasNa) SOBRE LA
PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS J774 Y CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA
NORMAL DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

YOLANDA CORDOVA GALAVIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

JULIO, 2016.



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
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**EFFECTO IN VITRO E IN VIVO DEL CASEINATO DE SODIO (CasNa) SOBRE LA
PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS J774 Y CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA
NORMAL DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

YOLANDA CORDOVA GALAVIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

JULIO, 2016.

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

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 25 de abril de 2016, aprobó la ratificación del jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna, **CÓRDOVA GALAVIZ YOLANDA** con número de cuenta **96583843** con la tesis titulada **"EFECTO IN VITRO E IN VIVO DEL CASEINATO DE SODIO (CasNa) SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS J774 Y CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA NORMAL DE RATÓN"**, bajo la dirección del Tutor Principal: **DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**.

Presidente: DR. BENNY WEISS STEIDER
Vocal: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Suplente: DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 06 de mayo de 2016.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDÍ ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al apoyo recibido por la beca CONACYT de doctorado número 169059, así como a los apoyos de Proyectos de investigación: Fondo SEP/CONACYT número 104025, PAPIIT IN225610 y IN220814.

A mi Tutor Principal, el Dr. Edelmiro Santiago Osorio, así como a los miembros del Comité Tutor, Dra. María Isabel Soto Cruz y Dra. Gloria Soldevila Melgarejo.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por su ayuda y apoyo para culminar este escrito.

Al Dr. Benny Weiss, Dr. Alberto Monroy, Dra. Isabel Soto Cruz, Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, y al Dr. Juan José Montesinos por su valioso tiempo y ayuda para éste trabajo.

Al Dr. Edgar Ledesma por su ayuda y apoyo en este trabajo.

A la M. en C. Itzen Aguíñiga por su ayuda y apoyo en este trabajo

A los compañeros del L8PB por su tiempo, ayuda, y gratos días laborales. Por aguantar mis días malos y asistirme cuando dos manos no son suficientes. Gracias.

A mis alumnos que me impulsan a ser mejor persona día con día. Gracias.

DEDICATORIA.

A MIS PADRES

A MIS HERMANAS

A MIS SOBRINOS

A TODOS AQUELLOS QUE CREYERON EN MI

ABREVIATURAS.

ATCC	de inglés: American type culture collection. Banco de células.
CMN	Células mononucleadas.
MON	Médula ósea normal.
MO	Médula ósea.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
SSA	Secretaría de Salud.
CasNa	Caseinato de Sodio.
IL-3	Interleucina-3.
SFB	Suero fetal bovino.
IMDM	Medio Iscove's Modified Dulbecco's.
CTH	Células troncales hematopoyéticas.
UFC-GEMM	Unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos.
CSF	Factores estimuladores de colonias.
SCF	Factor de células troncales.
Ara-C	Citarabina.
FAB	Grupo Franco-Americano-Británico.
OMS	Organización mundial de la salud.
FCH	Factores de crecimiento hematopoyético.
LMA	Leucemia mieloide aguda.
LPS	Lipopolisacárido.

ÍNDICE.

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. ANTECEDENTES.....	25
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6. RESULTADOS.....	30
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
8. CONCLUSIONES.....	46
9. PERSPECTIVAS.....	47
10. LITERATURA CITADA.....	48
11. APÉNDICE I. ARTÍCULO	63

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Tabla 1. Clasificación FAB de las Leucemias Mieloides Agudas.

Figura 1. Proliferación, viabilidad y diferenciación de la línea celular J774 en presencia o ausencia de CasNa a 72 h de cultivo.

Figura 2. Densidad celular, proliferación y viabilidad de J774 a 120 h.

Figura 3. Condiciones para el cocultivo de células J774 y CMN de MON de ratón

Tabla 2. Diferenciación morfológica de J774 a diferentes tiempos de cultivo sin y con CasNa.

Figura 4. Células J774, CMN y cocultivo de ambas con o sin CasNa.

Figura 5. Implantación del modelo de leucemia monocítica con J774.

Figura 6. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) del modelo murino de Leucemia Monocítica inducida por la línea celular J774, con o sin tratamiento de CasNa.

Figura 7. Proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratones BALB/c sobrevivientes, con o sin 5 ng/mL de rML-3.

RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad neoplásica de las células troncales de la sangre. La incidencia de LMA se incrementa con la edad, siendo la edad promedio de los pacientes de entre 65 a 75 años y a pesar de que es el tipo más común de leucemia en los adultos, sigue teniendo la menor tasa de supervivencia de todas las leucemias. Además, se presentan evidencias de que el Caseinato de Sodio (CasNa), una sal de la caseína, la principal proteína de la leche, tiene propiedades antileucémicas. Con el fin de evaluar esto, se cultivaron células leucémicas J774 y se inocularon en ratones BALB/c como un modelo murino; adicionalmente *in vitro* se obtuvieron las condiciones necesarias para probar el efecto diferencial del CasNa en cocultivos de células leucémicas y CMN de MON de ratón.

Nuestros resultados muestran CasNa *in vitro* inhibe la proliferación y se reduce la viabilidad de las células leucémicas J774, con una consecuente diferenciación a macrófagos maduros al mismo tiempo que favorece a las CMN de MON. Por otro lado, *in vivo*, en un modelo de ratón leucémico, el CasNa conduce un incremento de la supervivencia; estos resultados sugieren que el CasNa puede ser empleado como adyuvante en la terapia de la leucemia monocítica con fines de purga de células leucémicas y a la vez, potenciador de la hematopoyesis normal.

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a neoplastic disease of the blood stem cells. The incidence of AML increases with age, with the average age of patients between 65 to 75 years and although it is the most common type of leukemia in adults, still has the lowest survival rate of all leukemias. In the present work, we show evidence that sodium caseinate (CasNa) has significant anti-leukemic properties. In order to evaluate this, leukemic cells J774 were grown *in vitro* and inoculated into BALB/c mice as an *in vivo* murine model of leukemia. Further *in vitro* conditions were established to test the differential effect of CasNa in cocultures of the leukemic cell line J774 and mononuclear cells from mouse normal bone marrow (MNC from mouse NBM). The results show that CasNa *in vitro* conditions, inhibits cell proliferation, induces differentiation and reduces viability of the leukemic cells J774 and favors MNC of NBM; while *in vivo*, in a mouse monocytic leukemia model, CasNa leads to an increase in survival. Therefore, these results indicate that CasNa could be used as an adjuvant in leukemia therapy, purging monocytic leukemia cells as well as enhance normal hematopoiesis.

INTRODUCCIÓN

La hematopoyesis

Las células sanguíneas tienen como principales funciones el transporte de oxígeno y la defensa del organismo contra la invasión de agentes patógenos. Como se producen estas células es un proceso ampliamente caracterizado en cuanto a la biología de las células troncales y progenitoras, así como de las citocinas o factores de crecimiento hematopoyético (FCH) que regulan el proceso de hematopoyesis (Broxmeyer *et al*, 1999; Bruno *et al* 2004; Metcalf, 2007a y b).

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 & Catanzarro, 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, Burgess *et al*, 1980) por medio 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).

Una vez cumplida su función, las células maduras mueren por senescencia o bien durante el desarrollo de sus funciones normales (Hughes-Jones & Wickramasingh, 1991), al mismo tiempo, son restituidas gracias a la formación de nuevas células sanguíneas mediante la hematopoyesis (Orkin, 1995); 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.

El compartimento troncal corresponde al 0.01% del total de células en la médula ósea (MO), que tiene capacidad de auto-renovarse y dar origen a todas las células sanguíneas durante la vida de un individuo. Las células troncales humanas derivadas de sangre periférica, MO o sangre de cordón umbilical, se caracterizan por reconstituir la hematopoyesis a largo plazo en individuos mielosuprimidos (Fey, 2007), lo que funcionalmente les confiere la calidad de troncales. El compartimento progenitor constituye el 0.15% de las células de la MO y ha perdido la capacidad de autorrenovación 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 compartimento maduro representa el último estadio de diferenciación de las células hematopoyéticas (Montesinos & Mayani, 2002) presentes principalmente en torrente sanguíneo; éste compartimento tiene múltiples funciones vitales para el organismo, por mencionar algunas; los eritrocitos transportan el oxígeno, las plaquetas participan en el control de la coagulación sanguínea, mientras que los granulocitos, monocitos y linfocitos intervienen en la defensa inmune contra agentes extraños (Zambrano-Ramírez *et al*, 1999).

El sistema hematopoyético representa una continuidad de las células con propiedades y fenotipo cambiante según progresan a partir de células troncales hasta llegar a células

diferenciadas (Coulombel 2004). Una célula troncal según Metcalf (Metcalf, 2007a), es aquella célula hematopoyética que es capaz de auto-regenerarse y de ser multipotencial, y así, ser capaz de formar células maduras de los diferentes linajes hematopoyéticos. Las células troncales hematopoyéticas se dividen para formar más (auto regeneración) o para formar células progenitoras comprometidas al linaje linfoide o mieloide. Las células progenitoras mieloides son blastos grandes que pueden formar progenitores megacariocíticos-eritroides, encargados de formar la progenie megacariocítica y eritroide. Las células progenitoras mieloides pueden formar también progenitores de granulocito- macrófagos, que originan progenitores de granulocitos, macrófagos, y eosinófilos, y a partir de éstos se originan poblaciones maduras (Metcalf, 2007a). Los progenitores de células cebadas parten de las poblaciones de progenitores mieloides, pero no pasan por el estadio de progenitor granulocito-macrófago (Chen *et al*, 2005).

Las células troncales hematopoyéticas (CTH) se concentran principalmente en los nichos hematopoyéticos, se caracterizan por su alta capacidad proliferativa y de auto-renovación (Ogawa & Matsunaga, 1999; Orlic & Bodine, 1994), así como por la ausencia de características morfológicas o histoquímicas, propias de las células maduras o comprometidas hacia algún linaje celular. Estas células son consideradas totipotenciales, dado que son susceptibles de comprometerse hacia cualquiera de los linajes celulares sanguíneos mieloides y linfoides, cuando son estimuladas con la combinación de diferentes citocinas (Morrison *et al*, 1995; Ogawa 1993).

Las células del estroma medular son los elementos del tejido conectivo que forman un sistema que brinda soporte estructural y funcional para el desarrollo de las célula hematopoyéticas, estableciendo un microambiente único que provee las moléculas reguladoras del crecimiento (Munker *et al*, 1998; Prosper *et al*, 2001), y promueve las interacciones célula-célula, y célula matriz extracelular. Las células estromales (fibroblastos, adipocitos, células osteogénicas,

células endoteliales, y células de músculo liso) en su mayoría son de origen no hematopoyético, y por otro lado, son el único tipo de célula estromal derivado de las células troncales hematopoyéticas (Mayani *et al*, 2009).

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. El marcador 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 células troncales hematopoyéticas (Bonnet, 2003). Este antígeno se ha podido identificar solo en las células troncales y progenitoras pero 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 hematopoyéticos gracias en gran medida a la asociación de otro antígeno denominado CD38 quedando finalmente la nomenclatura para las CTH de humanos el fenotipo CD34⁺CD38⁻ (Glimm *et al*, 2001; Bhatia *et al*, 1997).

Ontológicamente, las CTH dan lugar a precursores mieloides comunes con marcadores adicionales al CD34⁺. Así, las UFC-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 brote eritroide 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 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 (Ohradanova-Repic *et al*, 2016).

Por su parte, las células progenitoras comprometidas con el linaje de megacariocitos se diferencian en promegacarioblastos, y de ahí hacia 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. Finalmente, 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. Se generan en la MO, a partir de las células progenitoras linfoides comunes

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 progenitor linfoide común en la MO envía su progenie que formará células T al timo, aquí los progenitores linfoides expresan CD25, el receptor de IL-2, el cual es crítico en el desarrollo y comprometimiento final de diferenciación. Durante la línea de diferenciación de células T, las células pre-T deben someterse al compromiso de convertirse en células CD4⁺ ayudadoras o en células CD8⁺ T citotóxicas (Fey, 2007).

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, y pueden 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), los primeros descritos con actividad que inducía el crecimiento clonal de diferentes linajes hematopoyéticos de la MO (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 mieloides puede desembocar en un proceso neoplásico maligno que genéricamente es conocido como leucemia mieloide.

Hematopoyesis sin control: Leucemia mieloide

La leucemia es un tipo de cáncer en la sangre iniciado por la mutación de una célula hematopoyética, en su mayoría, del compartimento troncal. La progenie clonal de esta célula alterada constituye una población heterogénea en la cual la proliferación y diferenciación desregulada, la cual induce 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 multivariado 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 (LLA), 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 LMA 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 LMA y ALL (Alharbi *et al*, 2013). 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 LMA, 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) (Tabla 1). Actualmente, estas clasificaciones están siendo sustituidas por las de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicadas en 2001, las cuales son mucho más amplias en sus objetivos e incluyen trastornos mieloproliferativos y linfoproliferativos crónicos (Vardiman, 2010). 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 (LMA) cuando 20 % o más de blastos aparecen en sangre periférica o MO, pudiendo ser un padecimiento de novo o por el contrario, evolucionar de SMD, neoplasia mieloproliferativa o mielodisplásica (SMD/NMP) previamente diagnosticada. En algunos casos, el diagnóstico de LMA puede prescindir del recuento de blastos en sangre periférica ó MO, por ejemplo cuando está asociado con anomalías genéticas específicas, y el umbral de blastos de 20% puede no ser un mandato para tratar al paciente como LMA; de esta manera las decisiones terapéuticas se basan en la situación clínica después de analizar toda la información disponible (Vardiman, 2010).

CLASIFICACIÓN FAB DE LAS LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS				
<i>Morfología</i>	<i>Histoquímica (1)</i>	<i>Inmunofenotipo (2)</i>	<i>Citogenética</i>	
M0	Indiferenciada	MPO + <3%; PAS y esterasa -	HLA-DR, CD13 CD33, CD34 +; CD7 Y TdT +/-	11q13; cambios complejos en 5 o 7; t(9,22) ocasionalmente
M1	Mieloide	MPO + <3%; PAS y esterasa -	Similar a M0 excepto CD15 +/-	-5, -7, -17, del 3 p, +21, +8
M2	Mieloide con diferenciación	MPO >10%; PAS y esterasa -	HLA-DR +; CD13, CD33 +; CD34 +/-; CD15 +	t(8; 21); del 3p o inv(3); -5, -7, t(6,9), +8
M3	Promielocítica	MPO ++; PAS y esterasa -	HLA-DR -; CD13, CD15, CD33, CD34 +/-	t(15;17)
M4	Mielomonocítica	MPO y esterasa +; PAS -	HLA-DR, CD14, CD15 +/-; CD4 débil +; CD34 +/-; CD33 > CD13; CD11b +	Inv(16) o -16q; t(8,21) a veces, -5, -7, +8
M5	Monocítica	MPO -; PAS y esterasa +		t(9;11) (p21;p23), +8
M6	Eritroleucemia	PAS ++; MPO y esterasa -	HLA-DR, CD13, CD33 +/-; glicoforina A ++	-7 o del (7q) y/o -5 o del -3, +8
M7	Megacarioblástica	PAS +/-; MPO y esterasa -	HLA-DR, CD34 +; CD33 +/-; CD41, CD61 + glicoproteína plaquetaria +	t(12;21) en 20-25%; hiperploidia; +8, +21

(1) MPO: mieloperoxidasa; PAS: ácido periódico de Schiff.

(2) TdT, HLA-DR, CD34: anticuerpos monoclonales frente a células precursoras; CD13, CD33, CD15: anticuerpos monoclonales frente a células mieloides; CD11 y CD14: anticuerpos monoclonales frente a células monocitarias.

Tabla 1. Clasificación FAB de las Leucemias Mieloides Agudas. Tomado de Beveridge & Urtasun, 2003.

La estadística en la leucemia

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 (SSA, 2008).

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 LMA 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, contrario a lo que publica Smith y colaboradores (1999), datos de casos nuevos presentados en México por el GLOBOCAN 2012 (IARC), se establece que los casos de pacientes masculinos tienen mayor incidencia (52%) respecto a los femeninos 48% solamente.

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 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, especialmente si el conteo de leucocitos es $>1 \times 10^4$ células/uL o de $>1 \times 10^3$ blastos/uL en sangre periférica. Por el contrario, cuentas superiores a 1×10^3 - 2×10^3 blastos/uL de sangre periférica, pueden ser suficientes para fines de diagnóstico y estratificación de LMA no-PML. El diagnóstico de PML se confirma mediante la demostración del reordenamiento PML-RAR alfa y la translocación 15:17 resultante; esto se analiza normalmente utilizando hibridación in situ fluorescente. Por su parte, la citometría de flujo multicolor ha sustituido paulatinamente a la tinción histoquímica como herramienta para establecer el linaje de las células blásticas, siendo los antígenos de linaje mieloide más empleados CD33, CD13, CD117 (CKIT), CD14, CD41 CD64 y glicoforina A (Estey & Döhner, 2006).

Tratamiento de LMA

El tratamiento para la LMA 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 (Roboz 2011).

La terapia moderna de inducción en la LMA comenzó en la década de 1960, cuando moléculas como el arabinósido de citosina (citarabina, Ara-C) y las antraciclinas, mostraron una importante actividad como agentes únicos (Rowe, 2007), desde entonces y hasta la actualidad, la Ara-C es la base de la terapia de inducción y de consolidación para la LMA 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 (Gimenez, 1986).

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 (Díaz-Beveridge & Aparicio, 2003).

La terapéutica de inducción clásica de la LMA 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 LMA 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 LMA, 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).

Leucemia M5

Las estadísticas nacionales son muy precarias en cuanto a subtipos de LMA, las estadísticas más recientes indican que la muerte por tumores malignos en México, ocupa el segundo lugar de mortalidad con 36.3%, dentro de esta categoría, la leucemia es el tercer lugar de causas de muerte (IMSS, 2004). Lo cual implica que los avances terapéuticos no han podido eliminar la enfermedad, ni en México ni en el mundo.

En cuanto a la leucemia monocítica, M5, apenas se ubica en el tercer lugar de frecuencias, después de M2 y M4 (Gupta *et al*, 2005).

Este subtipo de leucemia mieloide presenta dos variantes, la M5a con > 80% de blastos y peor tasa de sobrevivencia; y la M5b con <80% de blastos y mejor pronóstico (Tallman *et al*, 2004; Haferlach *et al*, 2002; Fung *et al*, 1995).

En general, la LMA del subtipo M5 tiene muy mala respuesta al tratamiento, no obstante que la tasa de remisión completa es similar al resto de LMA, la supervivencia global es significativamente menor que en subtipos como la M2 (Haferlach *et al*, 2002; Tallman *et al*, 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; Shu *et al*, 1999). 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; Russell *et al*, 1977).

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 (Stanovi'c & Borani'c, 1996) y una dieta privada de proteínas pero suplementada con caseína, 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). Asimismo, el CasNa induce activación de la hematopoyesis al incrementar el número de células mononucleadas de MO *in vivo* (Donahue *et al*, 1986), e inducir un aumento de los precursores de origen mieloide en la MO 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 Epss, 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. En este sentido, se ha reportado 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 MO, el CasNa sinergiza la proliferación de células mononucleadas de MON de ratón en presencia de interleucina 3 recombinante de ratón (rmIL-3) como factor de crecimiento (Ledesma-Martínez *et al*, 2012), mientras que al ser administrado intraperitonealmente a un ratón BALB/c sano, además de incrementar el índice esplénico, aumenta también el tamaño de los centros germinales (Lagunes, 2004) y recientemente se publicó que se promueve la granulopoyesis (Domínguez *et al*, 2012).

ANTECEDENTES

Pese a los avances en el conocimiento de la LMA, y a pesar de los avances en el diseño de fármacos, la tasa de supervivencia libre de enfermedad, es apenas cercana al 30%, lo cual implica que existen 70% de personas que recaen en la enfermedad, o mueren durante el tratamiento por infecciones colaterales (Büchner *et al*, 2005; Laubach & Rao, 2008). Esto es ocasionado principalmente, porque los fármacos que se utilizan para tratar los cuadros leucémicos, afectan también a la población de células normales de los pacientes, además de que en una recaída, estos fármacos pierden sus cualidades antineoplásicas y deben cambiar de tratamiento, resultando más agresivo, o no funcional. Así, los intentos por encontrar un tratamiento verdaderamente efectivo, han orientado la investigación hacia la terapia celular, pensando realmente en el antineoplásico ideal que permita purgar las células leucémicas del paciente (Park *et al*, 2002; Park *et al*, 2003) y realizar un trasplante autólogo, sin efectos colaterales.

En ésta área han surgido múltiples moléculas, la mayoría de origen natural, una de ellas, el CasNa, tiene efectos distintos en cultivos independientes de células normales, o leucémicas. Se sabe que *in vitro* el CasNa inhibe la proliferación de la línea celular leucémica J774 y favorece la hematopoyesis normal, por lo tanto, se espera que en un cocultivo de ambos tipos celulares el CasNa sea capaz de ejercer un efecto diferencial, repitiendo los efectos observados sobre los cultivos independientes.

Mientras que *in vivo* se ha observado un incremento en la hematopoyesis normal del ratón sano bajo tratamiento de CasNa, y una mayor supervivencia en ratones leucémicos tratados con la misma molécula, por lo tanto esperamos que la recuperación en los ratones leucémicos sea debida a la disminución de células leucémicas e incremento de la hematopoyesis normal.

HIPÓTESIS

El CasNa actúa de manera diferencial en cocultivos de células leucémicas y normales, inhibiendo la proliferación de células leucémicas y favoreciendo la proliferación de células normales de MO de ratón, mientras que *in vivo* induce la sobrevivencia de los ratones tratados debido a la eliminación de células leucémicas.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto *in vitro* e *in vivo* del CasNa en la proliferación y viabilidad de los cocultivos de células leucémicas J774 y células de MO de ratón BALB/c.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el cocultivo de células leucémicas J774 y células normales de MO de ratón BALB/c.
- Evaluar el efecto de CasNa en la proliferación y viabilidad de cocultivos de células normales y leucémicas J774 de MO de ratón.
- Establecer el modelo de leucemia en ratones BALB/c con células J774.
- Evaluar el efecto del CasNa sobre la sobrevivencia de ratones leucémicos inoculados con células J774.
- Evaluar la presencia de células J774 posterior al tratamiento de CasNa en las CMN de MO de ratones sobrevivientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea J774. Para este trabajo se empleó la línea de leucemia monocítica J774 de ratón (ATCC). 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), mantenida 37°C y 5% de CO₂ con cambio de medio cada 48 h.

Animales. Los procedimientos que involucraron animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ratones hembra y machos 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 MO de ratón. Para la obtención de células de MO, 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. Posteriormente, se aislaron las células mononucleadas mediante gradiente de densidad empleando Histopaque ($\delta=1.077\text{g/mL}$) (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.

Ensayos de proliferación y la viabilidad celular

Para evaluar la proliferación celular 1×10^3 células J774 y/o 1.0×10^5 CMN de MON de ratón fueron cultivadas durante 72 o 120 h, con o sin CasNa 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 (rmIL3) como factor de crecimiento, 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.

Para evaluar la viabilidad celular en las células J774 y CMN, después del cultivo, se evaluó por conteo directo una muestra celular en proporción 1:1 con colorante azul tripano 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.

Modelo de leucemia en ratones BALB/c empleando células J774 y tratamiento con CasNa. Para establecer el modelo de leucemia *in vivo* las células J774 se lavaron dos veces con PBS, fueron cuantificados con azul tripano para confirmar viabilidad mayor 95%, y se ajustaron a 1.0×10^6 células/0.5 mL. Se dividieron los ratones BALB/c (hembras y machos) en cuatro grupos de diez ratones cada uno, inoculados vía intraperitoneal (ip) con células J774. Posteriormente al inóculo, los ratones fueron tratados con PBS, CasNa (1 ml de CasNa 10% en PBS) o Arabinofuranosil citidina (Ara-C; 0,5 mg/ml), un antineoplásico, comenzando 48

horas después de inóculo celular y cada 48 h a partir de entonces. Se registró sobrevivencia en cada grupo. Al final de la serie de tratamientos, los ratones fueron sacrificados y los órganos y tumoraciones se pesaron. Se obtuvo índice esplénico, hepático y tumoral con base a la proporción de tumor o peso de los órganos respecto al peso del cuerpo.

Análisis estadístico. Todos los experimentos fueron individuales y se llevaron a cabo por triplicado. Los experimentos se repitieron tres veces, y los valores se expresan gráficamente como los valores promedio \pm DS. Se utilizó ANDEVA para el análisis estadístico, y $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Se utilizó Software estadístico (SPSS, EE.UU.) para llevar a cabo los análisis.

RESULTADOS

EL CASNA INHIBE LA PROLIFERACIÓN E INDUCE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS J774 A 72H DE CULTIVO.

Para corroborar que CasNa inhibiera la proliferación e indujera la diferenciación de la línea celular J774, se estimularon a las células con 0, 0.5, 1 y 2 mg/mL de CasNa durante 72 h. Los resultados permitieron corroborar que CasNa reduce la proliferación celular de manera dosis dependiente (Figura 1A), sin consecuencias para la viabilidad celular (Figura 1B); mientras que al evaluar la diferenciación morfológica de estos cultivos a 72 h, se encontró una inducción de la diferenciación de células blásticas en células J774 tratadas con 2 mg/ml de células blásticas a promonocitos (Figura 1C).

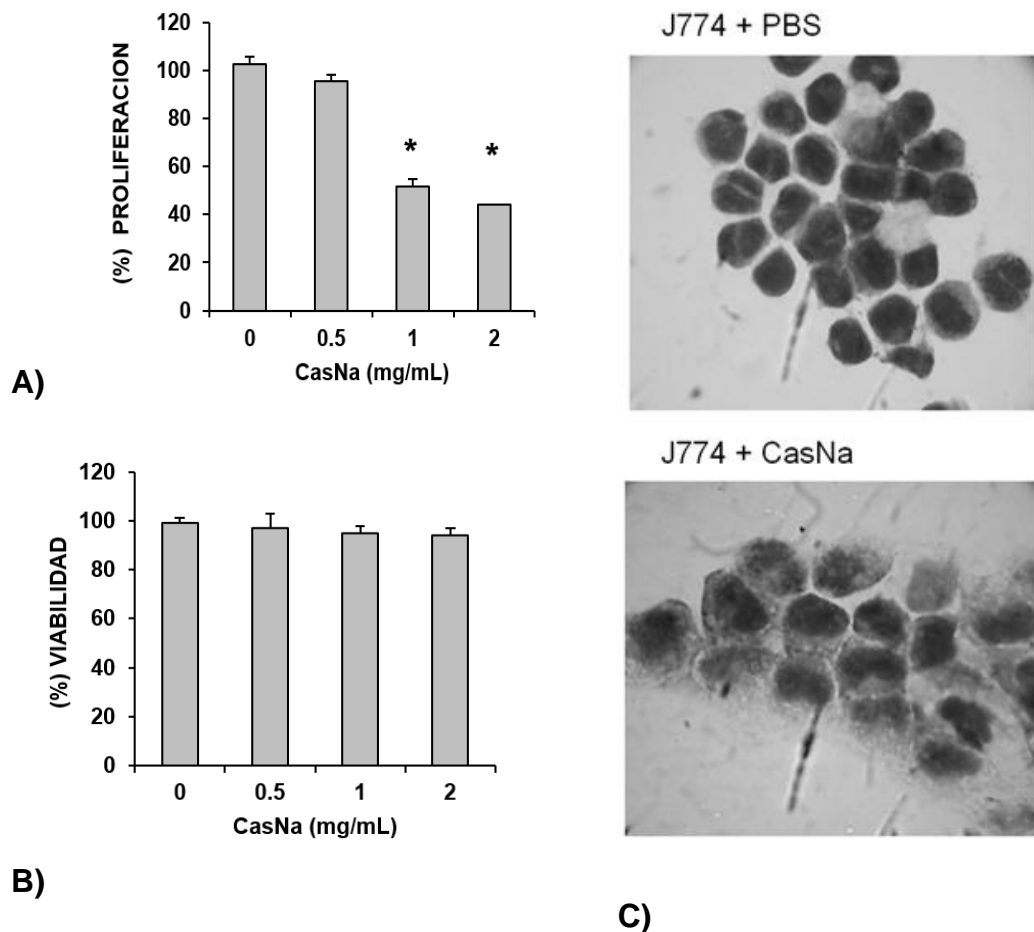


Figura 1. Proliferación, viabilidad y diferenciación de la línea celular J774 en presencia o ausencia de CasNa a 72 h de cultivo. La proliferación por conteo directo A) y la viabilidad B) por exclusión al azul tripano. La diferenciación morfológica C) por tinciones con Giemsa. Los datos ilustran el promedio y desviación estándar de tres ensayos independientes. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto al control (0 mg/mL) en el ANDEVA Dunnet.

LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE J774 POR CASNA ES TIEMPO DEPENDIENTE, REDUCIENDO LA VIABILIDAD E INDUCIENDO DIFERENCIACIÓN

Una vez que comprobamos que el CasNa afectaba negativamente la proliferación, y debido a que se pretendía evaluar el efecto diferencial del CasNa en células leucémicas J774, y células mononucleadas sanas extraídas de MO de ratón, se amplió el tiempo de exposición de J774 al CasNa hasta 120 h.

Al no conocer las condiciones de cultivo para las células J774 para tiempos mayores a 96 h, se evaluó la proliferación y viabilidad a 120 h por conteo directo y azul tripano empleando diferentes densidades celulares desde 500, 1000, 2000, 4000 y 10000 células/mL para encontrar la densidad celular que permite la proliferación sin afectar la viabilidad en cultivos prolongados. Los resultados indicaron que la proliferación con la densidad celular inicial de 1000 células J774 por mL es la idónea, ya que la viabilidad se mantiene al 100% y con buen crecimiento celular (Figura 2A y 2B). Una vez elegida la densidad celular se evaluó mediante cinética de proliferación y viabilidad, evaluadas cada 24 h, el efecto de CasNa sobre las células J774 en un cultivo a 120 h, además de corroborarse posteriormente con la técnica cristal violeta. Se observó que la proliferación celular disminuye por el tratamiento con el CasNa desde las 48 h (Figura 2C) y que la proliferación disminuye de manera tiempo dependiente, pues hay menos proliferación que la observada a 72 h de estímulo en proporción 10 vs 40% (Figura 2E y 1A respectivamente); mientras que la viabilidad disminuye hasta las 120 h (Figura 2D) en que el CasNa reduce la viabilidad hasta 20% a diferencia del control con PBS.

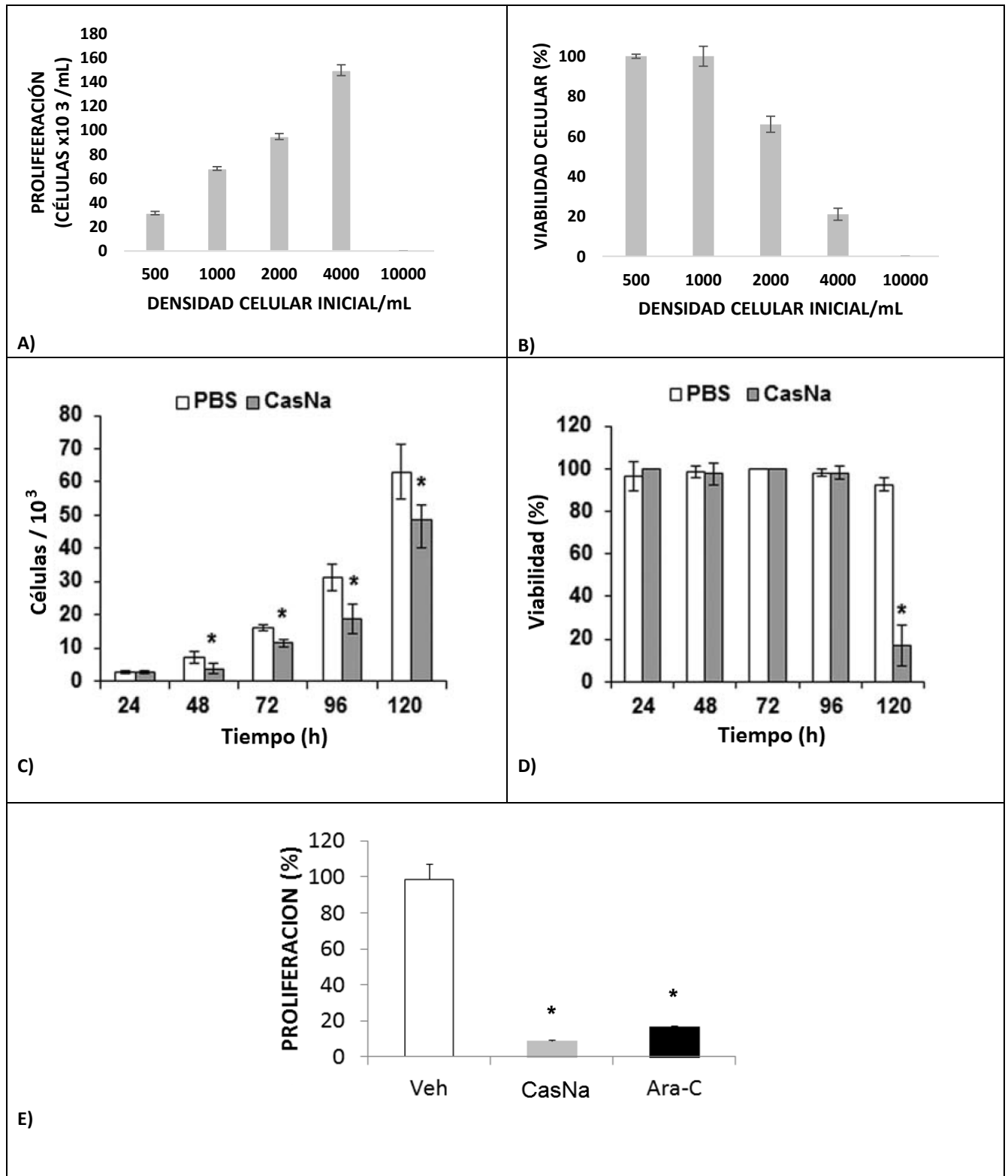


Figura 2. Densidad celular, proliferación y viabilidad de J774 a 120 h. Proliferación A) y viabilidad B) de células J774 con diferentes densidades a 120 h continuas sin y con CasNa, por conteo directo y azul tripano. Cultivo de 1000 células/mL J774 en cinética de proliferación C) y viabilidad D) a 120 h continuas sin y con CasNa, por conteo directo y azul tripano. Porcentaje de proliferación de células J774 E) con CasNa mediante la técnica cristal violeta. Datos provenientes de tres ensayos independientes con promedio y desviación estándar. Veh: PBS, Ara-C: antineoplásico citarabina. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto al control (0 mg/mL) en el ANDEVA.

Una vez establecida la densidad celular de J774 para cultivos a 120 h, y para corroborar la dosis a la que CasNa potenciaba la proliferación de cultivos de células de MO normal de ratón (Figura 3A), se encontró que a partir de 0.5 mg/mL ya favorece la proliferación, alcanzando el máximo a 2 mg/mL, razón por la que se eligió esta dosis. Sin embargo, debido a que las células J774 proliferan en un medio de cultivo diferente a las células mononucleadas de MON, se evaluó el efecto que tenían las condiciones de cultivo de éstas: con 5 ng/mL de IL-3, 15% SFB, 5% de suero equino (SE), sobre las células J774. Los resultados muestran que estas condiciones de cultivo no son perjudiciales para la proliferación de las células J774, por el contrario, les favorecen (Figura 3B, J774 con MON).

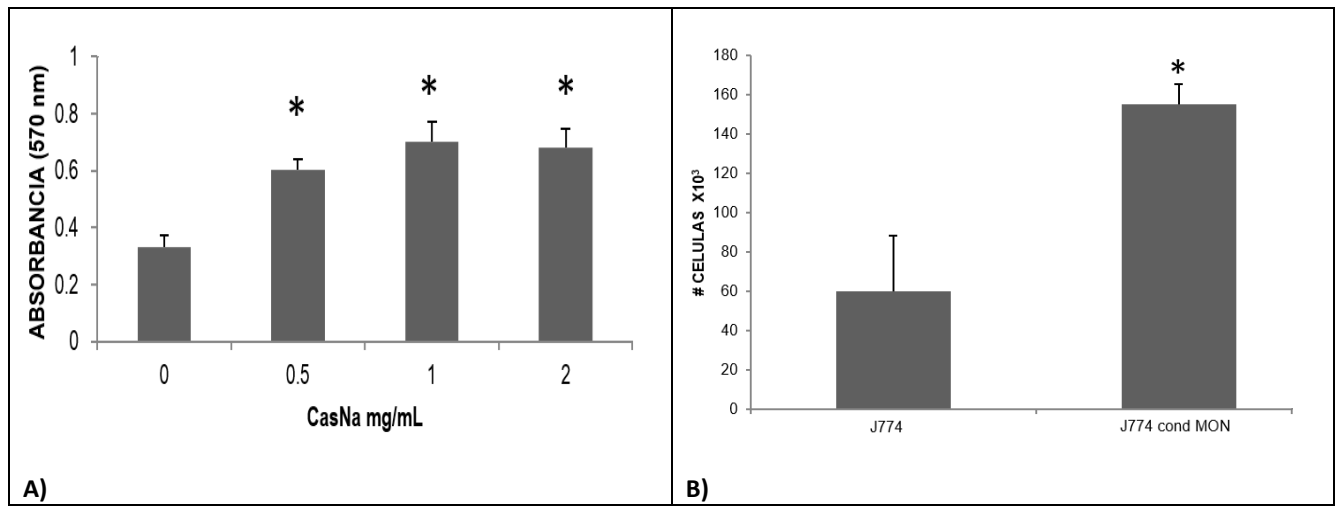


Figura 3. Condiciones para el cocultivo de células J774 y CMN de MON de ratón. A) Proliferación de células mononucleadas de MON de ratón, por cristal violeta. B) Células J774 en cultivo normal, y con medio de cultivo en condiciones de MON, conteo directo. Datos de tres ensayos independientes con promedio y desviación estándar. CasNa: caseinato de sodio; J774 cond MON: Células J774 cultivadas en presencia de IL-3, SFB, SE. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto al control (0 mg/mL) en el ANDEVA.

LA EXPOSICION DE J774 A 120 H DE ESTÍMULO CON CASNA INDUCE DIFERENCIACIÓN.

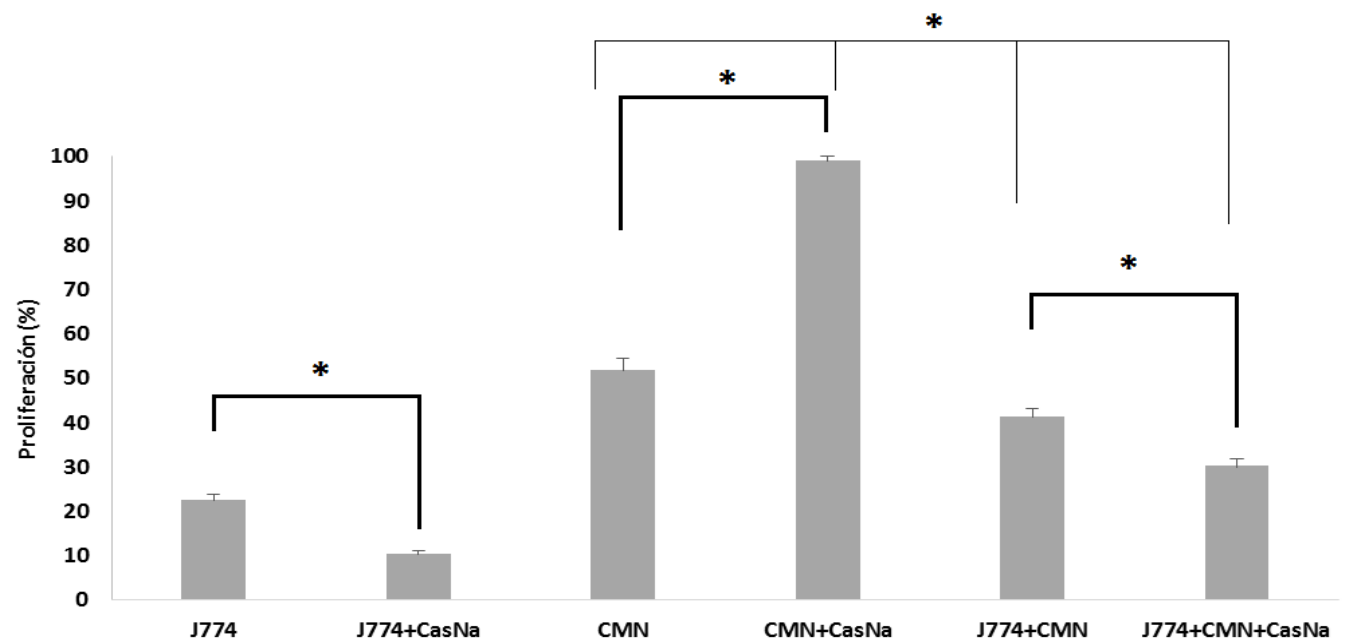
Al notar que la proliferación de las células J774 disminuía, así como la viabilidad, se evaluó la morfología celular que presentaban los cultivos celulares a 120 h continuas con tratamiento con CasNa. Los resultados muestran un incremento significativo de la diferenciación celular de células blásticas a monocitos, con respecto al control, hacia monocitos (Tabla 2).

TIEMPO	CONDICIÓN	MONOBLASTO	PROMONOCITO	MONOCITO
72 h	Control	82±2	14±8	4±5
	CasNa	59±3*	35±1*	6±4
120 h	Control	77±5	5±1	18±2
	CasNa	10±8*	12±3*	78±2*

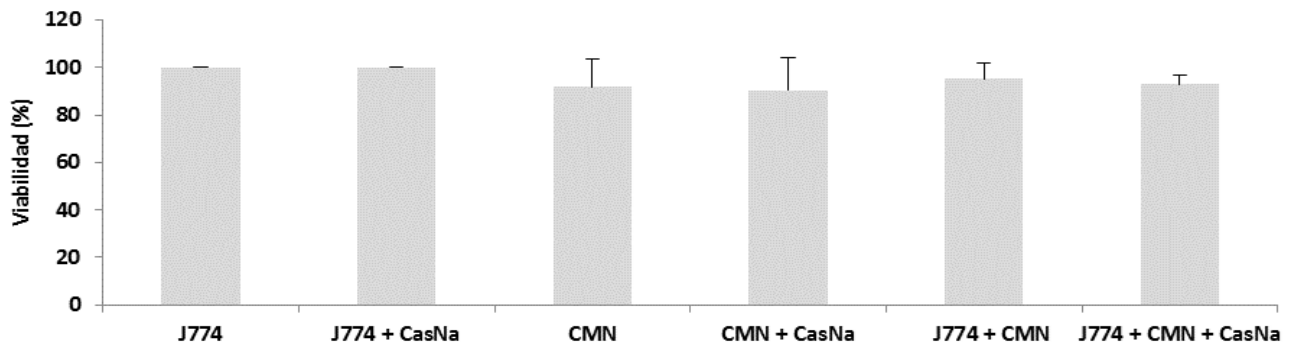
Tabla 2. Diferenciación morfológica de J774 a diferentes tiempos de cultivo en presencia y ausencia de CasNa. Tinción con Wright conteo de 100 células por condición. Control: PBS, CasNa 2 mg/mL. Significancia estadística * p<0.05 respecto al control. ANDEVA prueba Dunnet p<0.05

EL COCULTIVO DE CÉLULAS LEUCÉMICAS J774 CON CMN DE MON EN PRESENCIA DE CASNA TIENE MENOR PROLIFERACIÓN COMPARADO AL CULTIVO INDEPENDIENTE DE CMN DE MON/CASNA

Una vez que confirmamos que CasNa actúa de manera diferencial sobre cultivos individuales de células leucémicas y hematopoyéticas normales, en la misma concentración y tiempo de exposición, analizamos la proliferación de la población de cultivos individuales y cocultivo de células J774 y CMN. Los resultados mostraron que la proliferación de ambos tipos celulares en cocultivo sin CasNa reduce ligeramente la proliferación observada en el cultivo individual de CMN de MO (Figura 4A). Además la presencia de ambos tipos celulares en presencia de CasNa es similar al cultivo individual de CMN de MON sólo. No obstante que al adicionar CasNa al cocultivo se observa una ligera disminución de la proliferación (Figura 4A), la viabilidad se mantiene por arriba del 80% (Figura 4B).



A)



B)

Figura 4. Células J774, CMN y cocultivo de ambas con o sin CasNa. A) Proliferación celular evaluada por la técnica de cristal violeta B) Viabilidad celular evaluada por azul tripano. Resultados de tres repeticiones independientes. Se muestra promedio y desviación estándar. ANDEVA prueba Dunnet $p < 0.05$

LAS CÉLULAS J774 INDUCEN LA MUERTE DE RATONES BALB/C INOCULADOS, Y EL CASNA MEJORA LA SOBREVIVENCIA DE ESTOS RATONES LEUCÉMICOS

Se analizó el efecto de la administración intraperitoneal de 1×10^6 células J774, sobre la inducción de letalidad y en el estado general de salud del ratón sin y con tratamiento de CasNa; se consideraron grupos control de sólo células leucémicas J774, tratamiento con CasNa o vehículo (PBS), y antineoplásico Ara- C. Los ratones inoculados con 1×10^6 células J774 mostraron las características de la leucemia con incremento de peso (Figura 5A), y presencia de tumoraciones en los órganos blanco, hígado y bazo, además de presentar fuerte distensión abdominal y hemorragias intraperitoneales, signos inequívocos de leucemia (Figura 5B, 5C, 5D).

Con respecto a la sobrevivencia, los resultados muestran que las hembras mueren a partir del día 50, mientras que los machos sólo después de 70 días (Figura 6B y 6A, respectivamente); además se muestra que la sobrevivencia de los machos con tratamiento de CasNa fue del 50% mientras que la de las hembras fue del 60%. Todos los individuos del estudio presentaron las tumoraciones en hígado y bazo, y tumores en todo el intestino, se realizó un índice al dividir el órgano entre el peso corporal y se encontraron diferencias respecto al género. Particularmente, en los machos los síntomas aparecieron antes que en las hembras y en aquellos ratones que fueron tratados con CasNa, las tumoraciones, si existían, eran de un tamaño reducido como se muestra en los cocientes de bazo, hígado y tumor respecto al peso total del individuo de estudio (Figura 5B-5D).

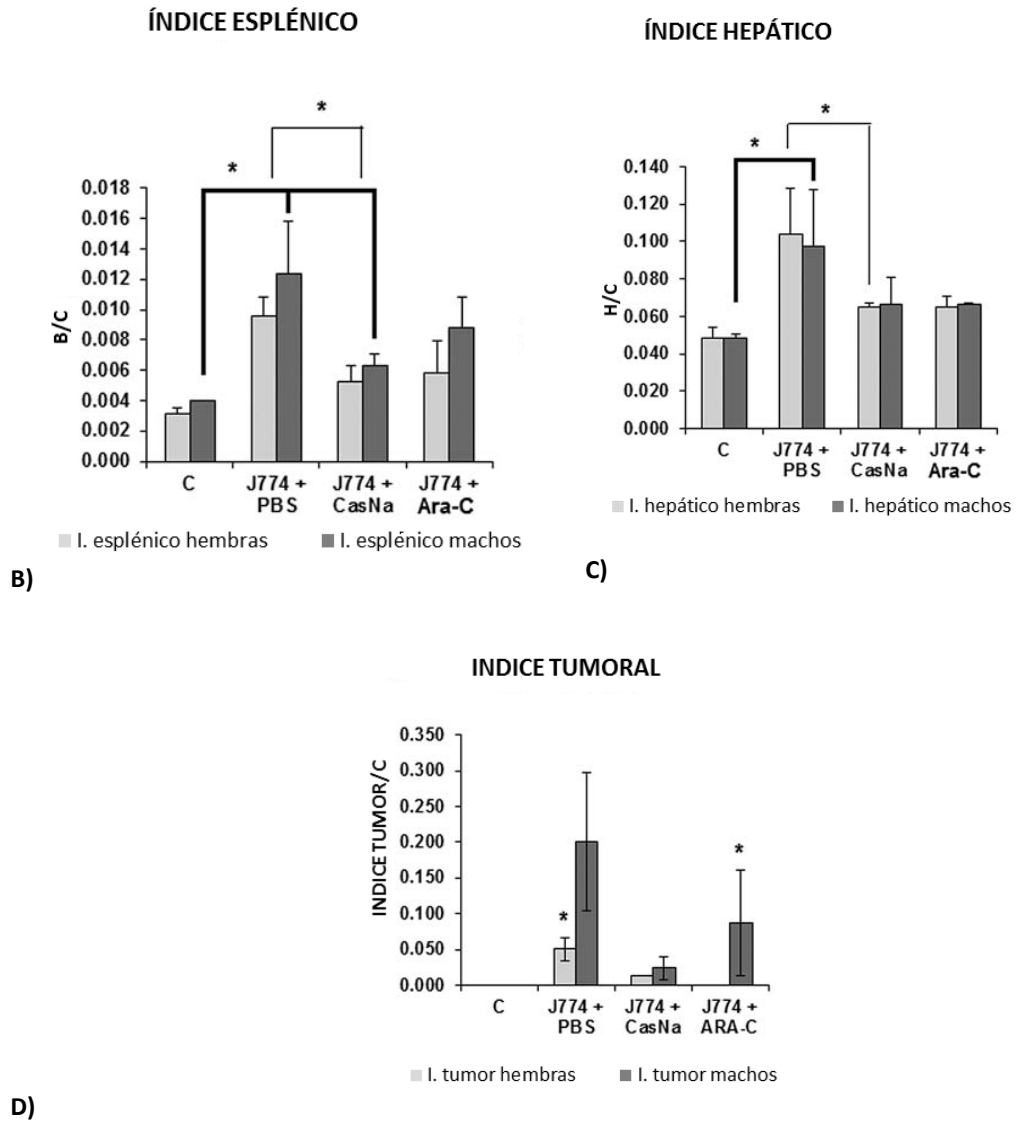
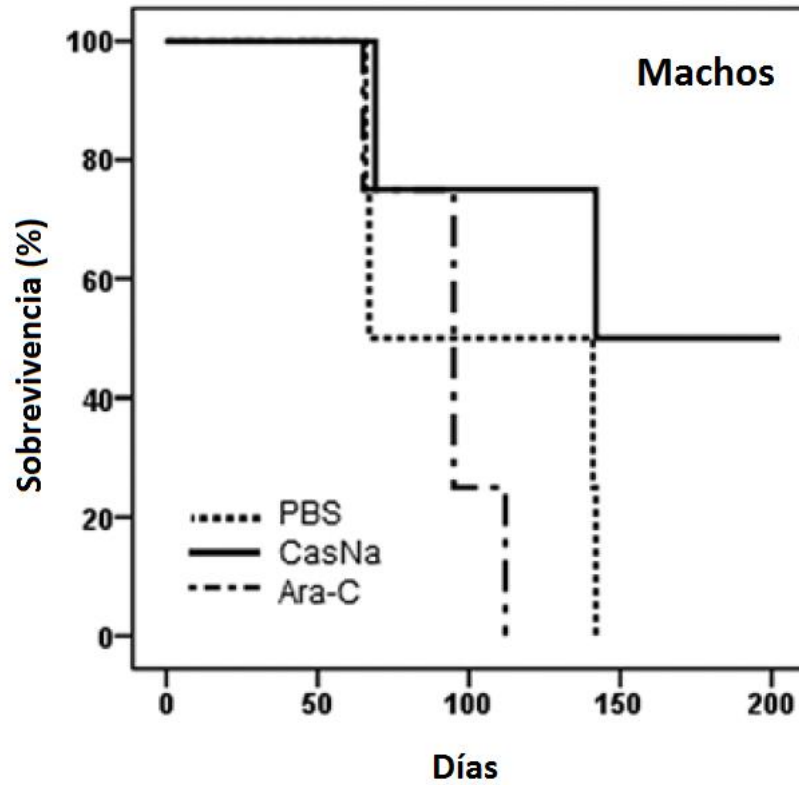
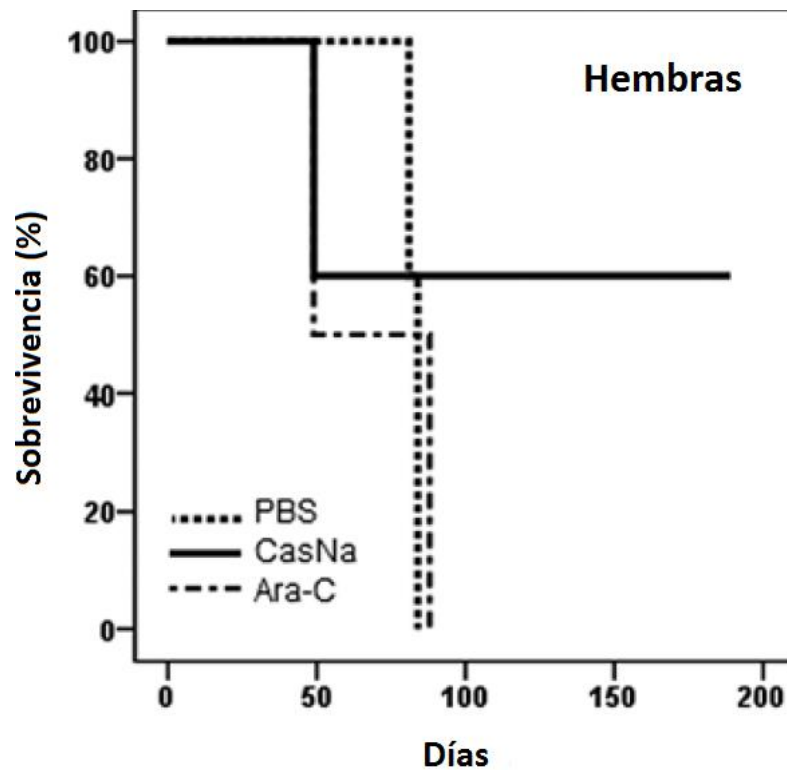


Figura 5. Implantación del modelo de leucemia monocítica con J774. A) Registro de peso de ratones BALB/c inoculados con 1×10^6 células J774, B) Índice esplénico, C) hepático y D) tumoral de ratones BALB/c hembras y machos inoculados intraperitonealmente con 1×10^6 células J774. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar de al menos tres ensayos independientes. Valores significativos en la ANDEVA prueba Dunnet * $p < 0.05$.



A)



B)

Figura 6. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) del modelo murino de Leucemia Monocítica inducida por la Línea celular J774, con o sin tratamiento de CasNa. Se evaluó la supervivencia de ratones BALB/c machos y hembras, inoculados con 1.0×10^6 células J774 por vía IP (intraperitoneal). (n=10).

LAS CMN DE MO OBTENIDAS DE RATONES QUE SOBREVIVIERON LA INOCULACIÓN DE CÉLULAS J774 Y EL TRATAMIENTO CON CASNA, SON INCAPACES DE PROLIFERACIÓN IN VITRO EN AUSENCIA DE IL-3

Para determinar si aún persistían células J774 en los ratones BALB/c que fueron tratados con CasNa y que sobrevivieron durante 260 días, se evaluó la proliferación de células mononucleadas de MON obtenidas de esos ratones, y se compararon con células mononucleadas de médula ósea de ratones sanos. Los resultados mostraron que las CMN de MO de ratones sobrevivientes tratados con CasNa no tenían la capacidad de proliferar *in vitro* en ausencia de rmlL-3 (Figura 7), sugiriendo que CasNa induce la purga de células de leucemia J774 en los ratones.

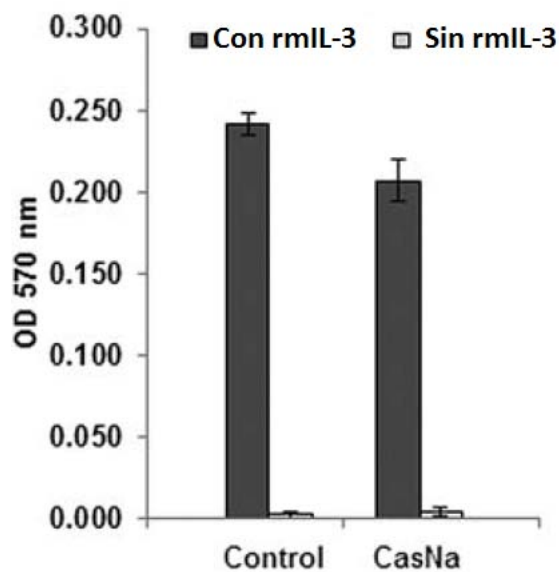


Figura 7. Evaluación de carga leucémica posterior al tratamiento. Proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratones BALB/c sobrevivientes, con o sin 5 ng/mL de rmlL-3. Control: CMN de MO de ratones sanos; CasNa: CMN de MO de ratones sobrevivientes al inóculo de J774 con tratamiento de CasNa. Técnica cristal violeta. Ensayo representativo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Uno de los grandes problemas a resolver en la terapia de la LMA, es curar o incrementar la tasa de supervivencia libre de enfermedad o a largo plazo (Tallman *et al*, 2005), panorama que hace crisis si la edad del paciente es superior a 65 años, ya que los tratamientos intensivos son poco tolerados o inducen muerte rápidamente, por lo que la tasa de supervivencia a 5 años es de apenas del 10 % (Visani *et al* 2000). Además, posterior a un tratamiento de quimioterapia para LMA con epipodofilotoxinas y antraciclinas (Pui *et al*, 1995), se han llegado a presentar leucemias secundarias particularmente del subtipo LMA (FAB) M5 ó leucemia monocítica aguda, uno de los subtipos de leucemia mas difíciles de tratar independientemente si es primaria o secundaria (Tallman *et al*, 2004; Al-tawfiq J & Al-khatti A, 2007; Muller *et al*, 2004; Creutzig *et al* 1987; Porcu y Cripe, 2000; Schwonzen *et al*, 1989; Cuttner *et al*, 1980; Dutcher *et al*, 1987).

Dado que la supervivencia a largo plazo libre de Leucemia Monocítica Aguda en pacientes de edad avanzada es tan sólo del 5% (Bennet *et al*, 1997; Laubach & Rao, 2008), se necesita encontrar otras estrategias de tratamiento, para lo cual es útil el uso de modelos de leucemia en ratón empleando a la línea leucémica monocítica de ratón J774, que se reconoce como un modelo de leucemia tipo M5a (Kasukabe *et al* 1987b; Tallman *et al*, 2004), un subtipo de LMA poco estudiado (Kasukabe *et al*, 1987a y b; Tarnowski *et al*, 1979; Castano *et al*, 2008). Por lo anterior, en este estudio se analizó el potencial antineoplásico del caseinato de sodio (CasNa) en un modelo de leucemia empleando la línea celular J774.

Se ha mostrado que el Caseinato de Sodio, una sal de caseína abate la proliferación de diferentes líneas celulares leucémicas, pero no de células hematopoyéticas normales *in vitro* (Ramos-Mandujano *et al*, 2008), mientras que favorece la granulopoyesis *in vivo* en ratones

sanos (Domínguez *et al*, 2012). Además, existen antecedentes que han demostrado que la caseína y algunos péptidos derivados del mismo tienen un papel en la regulación de la respuesta inmune (Wong *et al*, 1996), ya que modulan la función de linfocitos, neutrófilos y macrófagos (Pessi *et al*, 2001; Wong *et al*, 1996). Nuestro grupo de trabajo demostró que en periodos cortos de tiempo 72 h de cultivo (Aguíñiga 2008), el CasNa reduce la proliferación de la línea de leucémica monocítica J774, de manera dosis respuesta y sin afectar su viabilidad, e induciendo diferenciación celular de células blásticas a promonocitos (Aguíñiga 2008), lo cual corroboramos en este trabajo (Figura 1); sin embargo no se ha mostrado si el CasNa en un cocultivo de células leucémicas con células hematopoyéticas normales elimina o no a ambos tipos de células.

Debido a que la médula ósea se cultiva por 120 h, y nosotros requerimos realizar el cocultivo bajo estas condiciones, primero se analizó la respuesta de J774 en cultivo por 120 h de exposición al CasNa, se encontró que inhibe la proliferación y se induce diferenciación de las células tumorales (Figura 2B y Tabla 2), lo cual coincide con reportes previos pero en cultivos a 72 h (Aguíñiga 2008; Ramos *et al*, 2008). Una explicación de la reducción de la proliferación puede relacionarse al incremento en la diferenciación de las células (Guo y Hay, 1999; Smith, 2003), diferenciación que observamos en este trabajo (Tabla 2). Por otro lado, también encontramos reducción de la viabilidad celular de J774 (Fig 2C), la cual puede ser explicada por inducción de diferenciación celular (Lee *et al*, 1998; Valeri *et al*, 2010). Todo lo anterior plantea un escenario en el que el CasNa permite reducir la proliferación mientras se lleva a cabo al mismo tiempo la diferenciación hasta macrófago de las células malignas, todos elementos fundamentales para controlar el crecimiento y desarrollo de malignidades (Hanahan D & Weinberg RA 2000).

Con la finalidad de establecer las condiciones para un cocultivo de células mononucleadas normales con leucémicas, y considerando que las células mononucleadas requieren de suero fetal bovino, suero de equino e interleucina 3 (IL-3), se consideró pertinente establecer si las células leucémicas J774 proliferan bajo estas condiciones y se encontró que proliferan sin problemas (Figura 3B), por otro lado cuando se adicionaron 2 mg/mL de CasNa al cultivo individual de 120 h de células leucémicas J774 se redujo la proliferación (Figura 2A), pero la misma concentración de CasNa, en el mismo tiempo de estímulo, favorece la proliferación de CMN de MON (Figura 3A) en un cultivo independiente, lo cual concuerda con lo reportado previamente (Domínguez *et al*, 2012). Sin embargo, el cocultivo de ambos tipos celulares en presencia de CasNa disminuye la proliferación con respecto al cultivo de CMN de MON con CasNa (Figura 4A). Debido a que CasNa inhibe la proliferación de células J774 en cultivos independientes, pero no así de médula ósea normal, la única explicación de la reducción de la proliferación en el cocultivo se debe a la reducción de la proliferación de células leucémicas. La inhibición de la proliferación del cocultivo de células leucémicas con células normales llama la atención puesto que se ha publicado que el contacto de células malignas (LLC) con células normales induce la transformación maligna de las células normales inhibiendo el proceso de apoptosis (Lagneaux *et al*, 1986). Ante estos hechos sería interesante analizar en un futuro el mecanismo por el cual se reduce la proliferación en el cocultivo, y si el CasNa puede ayudar a purgar las células de médula ósea de pacientes con leucemia dejando solo a las células normales, una estrategia para tratamiento de leucemias explorado pero con poco éxito por los efectos tóxicos colaterales (García-Castro *et al*, 2003; Rizzieri *et al*, 2003).

Los resultados previos sugieren que las células leucémicas monocíticas son eliminadas en un cocultivo y no las normales, una forma de mostrar este hecho es que el CasNa prolongue la sobrevivencia de ratones leucémicos tratados. En este sentido, nuestros datos indican que el

CasNa rescata de la muerte tanto a machos como hembras tratados, abatiendo la sintomatología característica del individuo leucémico (Figura 5), lo cual es un buen pronóstico para abatir esta enfermedad, y un evento que no ocurre en los reportes existentes en este modelo a pesar de usar diferentes tratamientos con antineoplásicos (Castano *et al*, 2008; Anatelli *et al*, 2006; Tarnowski *et al*, 1979).

En este modelo de leucemia monocítica, también se encontró que los machos tienen una tasa de sobrevivencia mas reducida que las hembras (Figura 6), lo cual coincide con los reportes de sobrevivencia en humanos (Tallman *et al*, 2004); pero interesantemente, los sobrevivientes tratados con CasNa no tienen células leucémicas en la médula ósea ya que las células mononucleadas obtenidas de éste tejido, no proliferan en ausencia de IL-3, lo cual si ocurre en el modelo de leucemia empleando la línea leucémica mielomonocítica de ratón WEHI-3 (Ledesma *et al*, 2012). El aumento de la sobrevivencia por efecto de CasNa es un evento que de acuerdo a la literatura, por sí mismo es considerado evidencia de inhibición del crecimiento de las células leucémicas *in vivo* (Yoon *et al.*, 2008). Estos datos refuerzan la hipótesis de que el CasNa puede eliminar a las células leucémicas sin dañar a las normales, en otras palabras, puede favorecer la purga de médula ósea.

También se considera que el CasNa debe activar mecanismos más allá de un simple proceso inflamatorio, puesto que otros agentes como Zymosan o tioglicolato, que se sabe aumentan los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1 beta, TNF-alpha, MIP-2, MCP-1/CCL2) (Chadzinska *et al*. 2001; Matzukawa *et al.*, 2005), pero no tienen el efecto inhibitor en leucemia y en este trabajo mostramos que ninguno de los ratones sobrevivientes con tratamiento de CasNa mostraron signos de enfermedad (Figura 6, 7). Adicionalmente, aunque los macrófagos son parte de la respuesta inmune innata participan activamente en muchos aspectos de la

inmunidad y pueden contribuir tanto a la destrucción de tumores en su caso vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Ralph & Nakoinz, 1981), así mismo los neutrófilos al estar involucrados en la eliminación de células durante el rechazo de un injerto, han sido consideradas como células con un interesante potencial antitumoral, así se ha demostrado por ejemplo, en carcinoma gástrico que están asociados a la recuperación del paciente (Caruso *et al*, 2002).

Los resultados de este trabajo demuestran la capacidad del CasNa para el tratamiento de la leucemia tipo M5, enfermedad difícil de erradicar aún con los antineoplásicos hasta ahora empleados (Tarnowsky *et al*, 1979; Castano *et al*, 2008), donde los tratamientos convencionales siempre son fatales, y sólo una mezcla de terapia fotodinámica con dosis bajas de ciclofosfamida induce la sobrevida a 66% pero sólo sobreviven 120 días, con amputación de extremidades invadidas con células J774 24 h después del inóculo (Castano *et al*, 2008). En cambio, nuestro tratamiento con CasNa y sin amputación de extremidades, se incrementa la sobrevida al 40% y 60% en machos y hembras respectivamente por más de 2 años libres de enfermedad puesto que el cultivo de las CMN de MON obtenidos de estos individuos no proliferan en ausencia de IL-3; esto es sumamente relevante si recordamos que en humanos, en los casos clínicos se reporta que la tasa de sobrevivencia a 5 años es de sólo el 10% y a largo plazo sólo del 5%, así nuestros datos sugieren que los pacientes con leucemia M5 pueden beneficiarse del tratamiento con CasNa, incluso en aquellos pacientes que difícilmente sobreviven a un tratamiento intensivo, independientemente si es una leucemia primaria o secundaria.

Por otro lado, el hecho de que el CasNa elimine toda evidencia de presencia de células leucémicas en aquellos individuos que sobrevivieron a la enfermedad, sugiere que el CasNa

elimina selectivamente a las células leucémicas, un principio básico para explorar, en un futuro, una purga de células leucémicas y que favorezca además la proliferación de células normales, herramienta de utilidad para un trasplante autólogo en el tratamiento de malignidades hematológicas (Lee *et al*, 2003).

CONCLUSIONES

In vitro, la inhibición de la proliferación de J774 por estímulo de CasNa es tiempo dependiente, y si afecta la viabilidad en cultivos a tiempo prolongado, siendo responsable además de la inducción de la diferenciación hacia monocito-macrófago. Además el CasNa es responsable de inhibir la proliferación de los cocultivos de J774 aún en presencia de CMN de MON

In vivo, las células J774 inducen letalidad a ratones BALB/c inoculadas con 1×10^6 células, y el CasNa inyectado intraperitonealmente mejora la sobrevivencia de estos ratones leucémicos, incluso mejor sobrevivencia que el antineoplásico Ara-C. Esto es evidenciado por la ausencia de CMN de MO capaces de proliferar en ausencia de rmlL-3, células obtenidas posterior al tratamiento de CasNa de ratones sobrevivientes y recuperados en salud.

El mecanismo por el que estos eventos favorables de CasNa aún no es claro, de ahí que se necesitan más estudios al respecto.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos dejan incógnitas que aún deben resolverse, una de ellas es comprobar si existe diferenciación funcional en los cultivos de células leucémicas J774 a 120 horas en presencia de CasNa, así como identificar si existe apoptosis en el cultivo de J774 a 120 h, ya que eso permitirá corroborar que la caída de la viabilidad es ocasionada por la diferenciación de las células; prueba que también debe realizarse con los cocultivos de células leucémicas J774 con CMN de MON de ratón, a través de emplear técnicas sensibles a apoptosis o necrosis.

Por otro lado, es importante corroborar que las CMN de MO de los ratones sobrevivientes al inóculo de J774 y tratamiento con CasNa ya no tienen carga leucémica alguna, reinfundiéndolas en ratones sanos y evaluando la presencia de la sintomatología de la enfermedad, evento que dejaría en evidencia la purga *in vivo* de estas células leucémicas.

En este sentido, y debido a que encontramos que CasNa actúa selectivamente tanto *in vitro* como *in vivo*, el CasNa es también una propuesta para purgar *ex vivo* las células leucémicas de la médula ósea en pacientes con edad avanzada, y por consecuencia, poca resistencia a los tratamientos intensivos con antineoplásicos; y reinfundirlas al paciente en un trasplante autólogo ya libres de células leucémicas.

También es importante evaluar, si existe alguna combinación de CasNa/antineoplásico como un tratamiento que acelere la purga de células leucémicas tanto *in vivo*, como *ex vivo*.

LITERATURA CITADA

Alharbi R, Pettengell R, Pandha H, Morgan R. (2013). The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 27: 1000-1008.

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

Anatelli F, Mroz P, Liu Q, Yang C, Castano AP, Swietlik E, Hamblin MR. (2006). Macrophage-targeted photosensitizer conjugate delivered by intratumoral injection. *Mol Pharm* 3: 654-664.

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

Ayesh M, Khassawneh B, Matalkah I, Alawneh K, Jaradat S. (2012). Cytogenetic and morphological analysis of de novo acute myeloid leukemia in adults: a single center study in Jordan. *Balkan J Med Genet* 15: 5-10.

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

Bennett J, Young M, Andersen J, Cassileth P, Tallman M, Paietta E, Wiernik P, Rowe J. (1997). Long-term survival in acute myeloid leukemia: The Eastern Cooperative Oncology Group experience. *Cancer* 80: 2205-2209.

Bernard-Marty C, Mano M, Paesmans M, Accettura C, Munoz-Bermeo R, Richard T, Kleiber K, Cardoso F, Lobelle JP, Larsimont D, Piccart MJ, Di Leo A. (2003). Second malignancies following adjuvant chemotherapy: 6-year results from a Belgian randomized study

comparing cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) with an anthracycline-based regimen in adjuvant treatment of node-positive breast cancer patients. *Ann Oncol* 14: 693-698.

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

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

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

Broxmeyer H, Kim C, Cooper S, Hangoc G, Hromas R, Pelus L. (1999). Effects of CC, CXC, C, and CX3C Chemokines on Proliferation of Myeloid Progenitor Cells, and Insights into SDF-1-Induced Chemotaxis of Progenitors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 872: 142-163.

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

Bruno L, Hoffmann R, McBlane F, Brown J, Gupta R, Joshi C, Pearson S, Seidl T, Heyworth C, Enver T. (2004). Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells *in vitro*. *Mol Cell Biol* 24: 741-756.

Büchner T, Berdel W, Wörmann B, Schoch C, Haferlach T, Schnittger S, Kern W, Aul C, Lengfelder E, Schumacher A, Reichle A, Staib P, Balleisen L, Eimermacher H, Grüneisen

- A, Rasche H, Sauerland MC, Heinecke A, Mesters RM, Serve HL, Kienast J, Hiddemann W. (2005). Treatment of older patients with AML. *Crit Rev Oncol Hematol* 56: 247-259.
- Burgess A, Metcalf D. (1980). Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int J Cancer* 26: 647–654.
- Caruso RA, Muda AO, Bersiga A, Rigoli L, Inferrera C. (2002). Morphological evidence of neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human gastric adenocarcinomas. *Ultrastruct Pathol* 26: 315-321.
- Castano AP, Mroz P, Wu MX, Hamblin MR. (2008). Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5495-5500.
- Cavallo M, Fava D, Monettini L, Barone F, Pozzilli P. (1996). Cell mediated immune response to b-casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet* 348: 926-928.
- Chadzinska M, Maj M, Scislowska-Czarnecka A, Przewłocka B, Plytycz B. (2001). Expression of proenkephalin (PENK) mRNA in inflammatory leukocytes during experimental peritonitis in Swiss mice. *Pol J Pharmacol* 53: 715-718.
- Chen CC, Grimbaldston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ. (2005). Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11408-11413.
- Civin C, Strauss L, Fackler M, Trischmann T, Wiley J, Loken M. (1990). Positive stem cell selection basic science. *Prog Clin Biol Res* 333: 387-401.
- Clark B & Keating A. (1995). Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci* 770: 70-78.

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

Coulombel L. (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23: 7210-7222.

Creutzig U, Ritter J, Budde M, Sutor A, Schellong G. (1987). Early deaths due to hemorrhage and leukostasis in childhood acute myelogenous leukemia. Associations with hyperleukocytosis and acute monocytic leukemia. *Cancer* 60: 3071-3079.

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

Cuttner J, Conjalka MS, Reilly M, Goldberg J, Reisman A, Meyer RJ, Holland JF. (1980). Association of monocytic leukemia in patients with extreme leukocytosis. *Am J Med* 69: 555-558.

Deschler B & Lübbert M. (2006). Acute myeloid leukemia: Epidemiology and Etiology. *Cancer* 107: 2099–2107.

Díaz-Beveridge R & Aparicio Urtasun J. (2003) Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos secundarios al tratamiento oncológico. *An Med Internal (Madrid)* 20: 257-268.

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

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

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. (2008). Macrophage colony stimulating factor: not just for macrophages anymore! A gateway into complex biologies. *Int Immunopharmacol* 8: 1354-1376.

Dutcher J, Schiffer C, Wiernik P. (1987). Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: Impact on remission rate and duration and survival. *J Clin Oncol* 5: 1364-1372.

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

Fey MF. (2007). Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol* 18: 1i9–i13.

Fung H, Shepherd J, Naiman S, Barnett M, Reece D, Horsman D, Nantel S, Sutherland H, Spinelli J, Klingemann H, Phillips G. (1995). Acute monocytic leukemia: a single institution experience. *Leuk Lymphoma* 19: 259-265.

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

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

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

Glimm H, Eisterer W, Lee K, Cashman J, Holyoake T, Nicolini F, Shultz L, von Kalle C, Eaves C. (2001). 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.

Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.

Guía práctica clínica. (2010). Diagnóstico y tratamiento de la Leucemia Mieloide Aguda. México. Secretaria de Salud.

Gupta V, Chun K, Yi QL, Minden M, Schuh A, Wells R, Brandwein J. (2005). Disease biology rather than age is the most important determinant of survival of patients > or = 60 years with acute myeloid leukemia treated with uniform intensive therapy. *Cancer* 103: 2082-2090.

Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. (2008). Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 22:1539-1541.

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

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

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

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

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

Hughes-Jones N & Wickramasingh E. (1991). Lecture notes on haematology. Ed. Blackwell Scientific Publications, London. 225 pp,.

IMSS. (2004). El IMSS en cifras: la mortalidad en la población derechohabiente, 2003. *Rev Med IMSS* 42: 353-364.

Jacobsen S, Ruscetti F, Ortiz M, Gooya J, Keller J. (1994). The growth response of Lin-Thy-1+ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy of multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. *Exp Hematol* 22: 985-989.

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

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

Kasukabe T, Honma Y, Hozumi M, Suda T, Nishii Y. (1987a) Control of proliferating potential of myeloid leukemia cells during long-term treatment with vitamin D3 analogues and other differentiation inducers in combination with antileukemic drugs: *in vitro* and *in vivo* studies. *Cancer Res* 47: 567-572.

Kasukabe T, Okabe-Kado J, Honma Y, Hozumi M. (1987b). Production by undifferentiated myeloid leukemia cells of a novel growth-inhibitory factor(s) for partially differentiated myeloid leukemic cells. *Jpn J Cancer Res*. 78: 921-931.

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

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

Koletzko B, Aggett P, Bindels J, Bong P, Ferre P. (1998). Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British J Nutrition* 80: S5-S45.

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

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

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

Lee, N. S., Cheong, H. J., Kim, S. J., Kim, S. E., Kim, C. K., Lee, K. T., Park S, Baik S, Hong D, Park H & Won, J. H. (2003). *Ex vivo* purging of leukemia cells using tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand in hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 17: 1375-1383.

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

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

Ling X, Wang Y, Dietrich M, Andreeff M, Arlinghaus R. (2006). Vaccination with leukaemia cells expressing cell-surface-associated GM-CSF block leukaemia induction in immunocompetent mice. *Oncogene* 25: 4483.

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

Mayani H, Flores-Figueroa E, Chávez-González A. (2009). *In vitro* biology of human myeloid leukemia. *Leuk Res* 33: 624-637.

Matsukawa A, Kudo S, Maeda T, Numata K, Watanabe H, Takeda K, Akira S and Ito T. (2005). Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J Immunol* 175: 3354-3359.

Metcalf D, Robb L, Dunn A, Mifsud S, Rago L. (1996). 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.

Metcalf D. (2007a). On hematopoietic stem cell fate. *Immunity* 26: 669-673.

Metcalf D. (2007b). Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells* 25: 2390-2395.

Metcalf D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* 111: 485-491.

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

Morrison S, Uchida N, Weissman I. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 35-71.

Muller C, Trepel M, Kunzmann R, Lais A, Engelhardt R, Lbbert M. (2004). 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.

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

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

Ogawa M, Matsunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Annu Acad Sci* 872: 17-24.

Ogawa M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844-2853.

Ohradanova-Repic A, Machacek C, Fischer M and Stockinger H. (2016). Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel. *Clinical & Translational Immunol* 5: e55.

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

Orkin S. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270: 4955-4958.

Orlic D & Bodine D. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up? *Blood* 84: 3991-3994.

Park W, Myung S. LEE, Keunchil Park, Eun S. Kim, Byoung K. (2002). Monensin-mediated growth inhibition in acute myelogenous Leukemia cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Cancer* 101: 235–242.

Park HS & Won JH. (2003). *Ex vivo* purging of leukemia cells using tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand in hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 17: 1375-1383.

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

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

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

Porcu P, Cripe LD, Ng EW, Bhatia S, Danielson CM, Orazi A, McCarthy LJ. (2000). Hyperleukocytic leukemias and leukostasis: a review of pathophysiology, clinical presentation and management. *Leuk Lymphoma* 39: 1-18.

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

Pui C, Relling M, Rivera G, Hancock M, Raimondi S, Heslop H, Santana V, Ribeiro R, Sandlund J, Mahmoud H. (1995). Epipodophyllotoxin-related acute myeloid leukemia: A study of 35 cases. *Leukemia* 9: 1990-1996.

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

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

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

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

Ramos-Mandujano, Melo B, Córdova Y, Ledesma E, Muñoz L, Sanchez L, García A, Weiss B, Santiago-Osorio E. (2008). Alpha, beta and kappa caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiology* 213: 133-141.

Rao J, Xu D, Zheng F, Long Z, Huang S, Wu X, Zhou W, Huang R, Liu Q. (2011). 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.

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

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

- Roboz G. (2011). Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 43-50.
- Rowe J. (2007). Innovative approaches in the treatment and support of patients with acute myelogenous leukemia. *Oncologist* 12:1.
- Ruiz-Argüelles G, Gomez-Almaguer D, Ruiz-Delgado G, y Tarin Arzaga L. (2007). Ocho años de experiencia con el "Método Mexicano" en la realización de transplantes de células hematopoyéticas alogénicas. *Gac Méd Méx* 3: 231-235.
- Russell M, Brooker B, Reiter B. (1977). 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.
- Santiago-Osorio E, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Martínez I, Ramos-Mandujano G, *et al.* (2010). Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology* 215: 332-339.
- Schwonzen M, Kuehn N, Vetten B, Diehl V, Pfreunds Schuh M. (1989). Phenotyping of acute myelomonocytic (AMMOL) and monocytic leukemia (AMOL): association of T-cell-related antigens and skin-infiltration in AMOL. *Leuk Res* 13: 893-898.
- Shu X, Linet M, Steinbuch M, Wen W, Buckley J, Neglia J. (1999). Breast-feeding and risk of childhood acute leukemia. *J Natl Cancer Inst* 91: 1765-1772.
- Stanovi'c S, Borani'c M. (1996). Neuropeptides, endogenous opioid peptides and cell proliferation. *Lijec Vjesn* 121: 82-87.
- Stone R, O'Donnell M, Sekeres M. (2004). Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 98-117.

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

Tallman MS, Kim HT, Paietta E, Bennett JM, Dewald G, Cassileth PA, Wiernik PH, Rowe JM; Eastern Cooperative Oncology Group. (2004). Acute monocytic leukemia (French-American-British classification M5) does not have a worse prognosis than other subtypes of acute myeloid leukemia: a report from the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 22: 1276-1286.

Tarnowski G, Ralph P and Stock C. (1979). Sensitivity to Chemotherapeutic and Immunomodulating Agents of Two Mouse Lymphomas and of a Macrophage Tumor. *Cancer Res* 39: 3964-3967.

Tatsuta M, Lishi H, Taniguchi H. (1992). Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in Wistar rats fed a low-protein diet. *Int J Cancer* 50: 108-111.

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

Vardiman J. (2010). 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.

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

Visani G, Pagano L, Pulsoni A, Tosi P, Piccaluga PP, Pastano R, Grafone T, Malagola M, Isidori A, Tura S. (2000). Chemotherapy of secondary leukemias. *Leuk Lymphoma* 37: 543-549.

Walstra P & Jenness R. (1984). Dairy chemistry and physics. Ed. John Wiley Sons, New York, USA. 106 pp.

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

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

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

Zambrano-Ramírez IR, Santiago-Osorio E, Weiss-Steider B, Cáceres-Cortés JR. (1999). Biology of hematopoietic stem cells. *Rev Invest Clin* 51: 53-68.

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

Sodium Caseinate Induces Increased Survival in Leukaemic Mouse J774 Model

YOLANDA CÓRDOVA-GALAVIZ¹, EDGAR LEDESMA-MARTÍNEZ¹,
ITZEN AGUÍNIGA-SÁNCHEZ¹, GLORIA SOLDEVILA-MELGAREJO², ISABEL SOTO-CRUZ³,
BENNY WEISS-STEIDER¹ and EDELMIRO SANTIAGO-OSORIO¹

¹Hematopoiesis and Leukaemia Laboratory, and

³Oncology Laboratory, Research Unit on Cell Differentiation and Cancer, FES-Zaragoza, and

²Department of Immunology, Institute of Biomedical Research,
National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

Abstract. *Background:* Acute myeloid leukaemia is a neoplastic disease of haematopoietic stem cells. Although there have been recent advances regarding its treatment, mortality remains high. Consequently, therapeutic alternatives continue to be explored. In the present report, we present evidence that sodium caseinate (CasNa), a salt of the principal protein in milk, may possess important anti-leukaemic properties. *Materials and Methods:* J774 leukaemia macrophage-like cells were cultured with CasNa and proliferation, viability and differentiation were evaluated. These cells were also inoculated into BALB/c mice as a model of leukemia. *Results:* We demonstrated that CasNa inhibits the *in vitro* proliferation and reduces viability of J774 cells, and leads to increased survival *in vivo* in a leukaemic mouse model. *Conclusion:* These data indicate that CasNa may be useful in leukaemia therapy.

Acute myeloid leukaemia (AML) is a neoplastic disease of blood stem cells that is characterized by the continuous clonal proliferation of myeloid precursors that fail to differentiate or mature into terminal cells (1). The M5 subtype, or acute monocytic leukaemia, displays characteristic clinical features, and the disease is associated with a poor prognosis compared to other subtypes of AML, although this has not been clearly established (2-4). Most importantly, this disease may develop after chemotherapy, particularly following epipodophyllotoxin and anthracycline treatments (5). Thus, cases of M5 AML have been reported in patients with breast cancer and all of

these AML cases were fatal. The increased crude incidence of AML is statistically significant (6). Despite the importance of the M5 subtype of leukaemia, very few studies on new drugs designed to treat this disease have been reported.

CasNa, the principal protein in milk and an important component of the human diet, could be useful in leukaemia treatment because it acts as a proliferation and activation regulator and as an activator of blood cells. For example, beta-casein, a component of bovine casein, has been found to activate free radical production in granulocytes and to induce lymphocyte proliferation (7). Casin also functions as an inflammatory agent that can induce the migration of myeloid and lymphoid cells into the peritoneal cavity (8). We have recently shown that sodium caseinate (CasNa), a salt of casein, inhibits the proliferation of several leukaemia cell lines, including the J774 leukaemia macrophage-like cell line (9), a model of macrophage-like tumour M5 AML (10, 11).

The present study was performed to determine whether CasNa exerts anti-leukaemic effects *in vivo* as it does *in vitro*.

Materials and Methods

Experimental animals. Female BALB/c mice between 8 and 12 weeks of age were used and maintained in pathogen-free conditions. The experiments were carried out in the animal facility of Zaragoza School of Advanced Studies, National Autonomous University of Mexico in accordance with the institutional guidelines. The mice were provided with autoclaved water and fed a standard powdered rodent diet *ad libitum*. All experimental protocols were approved with the number FESZ/DEPI/CI/128/14 by the Ethics Committee of Zaragoza Faculty of Advanced Studies, in accordance with the national and international regulations for the care and use of experimental animals.

Cell culture. The J774 leukaemia macrophage-like cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). The cells were cultured in hydrophobic surface Petri dishes (Sarstedt AG & Co., Germany) with Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Gibco-BRL, Carlsbad, CA,

Correspondence to: Dr. Edelmiro Santiago Osorio, Hematopoiesis and Leukaemia Laboratory (L-8PB), UMIEZ, FES-Zaragoza Campus II, National Autonomous University of Mexico, Batalla de 5 de Mayo s/n Colonia Ejercito de Oriente. C.P. 09230, Mexico City, Mexico. E-mail: edelmiro@unam.mx

Key Words: CasNa, BALB/c, AML, leukaemia model.

USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C, and the culture medium was changed every two days.

Sodium caseinate. CasNa (Spectrum, New Brunswick, NJ, USA) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) at a concentration of 100 mg/ml. Autoclaved dilutions were prepared with PBS to yield concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 mg/ml.

Proliferation assay and cell viability. To evaluate cell proliferation, 1×10³ J774 leukaemia macrophage-like cells were cultured for 72 h with a range of CasNa concentrations (0, 0.5, 1.0 or 2.0 mg/ml) in 96-well plates (Corning Costar, St. Louis, MO, USA). Proliferation was assessed by direct quantification using a Neubauer chamber, and Trypan blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) exclusion assays were employed to determine the number of viable cells in each culture; unstained cells were counted as viable. The results are expressed as the mean percentage of cell viability±standard deviation (SD) of triplicate cultures. Additionally, an assessment of the J774 cells (in the presence or absence of 2 mg/ml of CasNa) at 24 h intervals for up to five days was carried out and representative photographs of cell morphology were taken.

Sulforhodamine B (SRB) assay. To evaluate cell viability, 1×10³ J774 cells were cultured for 120 h with CasNa (2 mg/ml) in 96-well plates (Corning Costar, St. Louis, MO, USA) and subsequently assessed using the SRB colorimetric test (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Briefly, trichloroacetic acid was added to each well to fix the cells, which were then incubated at 4°C for 1 h and washed several times. The plates were dried at room temperature, and SRB dye (0.4% acetic acid 1% dilution) was added and the cells incubated for a further 5 min at room temperature to stain cells. The plates were then washed with 1% acetic acid and dried at room temperature. Finally, the dye was solubilised with Tris base (pH 10.5), and the absorbance was determined using a plate reader (Tecan Spectra, Grödig, Austria) at a wavelength of 550 nm. The results are expressed as the mean percentage of cell viability±standard deviation (SD) of triplicate independent cultures.

Establishment of the leukaemia mouse model. J774 cells were washed twice with PBS, quantified with Trypan blue to confirm >95% viability, and adjusted to a density of 1.0×10⁶ cells/0.5 ml. BALB/c mice (females and males) were divided into four groups of eight mice each, injected intraperitoneally (*i.p.*) with J774 cells, and monitored for survival. Upon death, the mice were weighed and spleens, livers and tumour samples were obtained and weighed individually; respective indices were determined as the ratio of either tumour or organ weight to body weight.

Antileukaemic activity in BALB/c mice. Four groups of eight BALB/c mice were used. One group of mice served as the negative control treated only with PBS (1 ml injected *i.p.*), and the three remaining groups were injected *i.p.* with 0.5 ml of J774 cells. These three groups were treated with PBS, CasNa (1 ml of CasNa 10% in PBS), or 0.5 mg/ml of arabinofuranosyl cytidine (Ara-C.) (Lamery, D.F. Mexico), an antineoplastic agent, starting 48 h after cell inoculum and every 48 h thereafter. The treated groups and

control groups were observed for survival. At the end of treatment series, the mice were sacrificed and the tissues were weighed individually.

Presence of mononuclear cells in the bone marrow of BALB/c mice. Total bone marrow cells from mice that survived the inoculation of J774 cells and were treated with CasNa or Ara-C were extracted from the femur and flushed with IMDM supplemented with 10% FBS. Mononuclear cells (MNCs) were isolated from total cells via gradient separation with Ficoll-Paque (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) at a density of 1.077 g/ml, and they were washed twice with PBS. MNCs were cultured for 120 h in IMDM supplemented with 15% (*v/v*) FBS, 5% (*v/v*) horse serum (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA) and 5 ng/ml recombinant mouse interleukin-3 (rIL3; R&D System, Minneapolis, MN, USA) or PBS. The cells were cultured in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C for a maximum duration of 120 h, cell proliferation was then assessed as previously described.

Statistical analyses. All individual experiments were carried out in triplicate. All experiments were repeated three times, and the values are expressed graphically as the average values±SD. One-way ANOVA was used for statistical analysis, and *p*<0.05 was considered statistically significant. Statistical software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) was used to perform the analyses.

Results

CasNa inhibits proliferation without affecting viability of J774 cells, but induces differentiation. CasNa was able to inhibit the proliferation of J774 leukaemia cells, as we have shown previously (9). Assessment *via* Neubauer quantification shows that CasNa at 1 and 2 mg/ml inhibits proliferation without affecting cell viability, while inducing an increase of macrophagic differentiation (Figure 1A-D).

CasNa inhibits proliferation of J774 cells in a time-dependent manner and reduces viability after 120 h of stimulation, as does Ara-C. We extended the culture time in the presence of 2 mg/ml CasNa and evaluated the proliferation and viability at 24-h intervals. The results show that after 48 h, CasNa inhibited the proliferation of J774 cells (Figure 2A). Interestingly, a Trypan blue exclusion assay revealed that J774 cell viability significantly decreased at 120 h (Figure 2B). Moreover, to compare this inhibition of viability with respect to the anti-neoplastic agent Ara-C, an SRB assay, revealed that CasNa induced a greater reduction in J774 cell viability (Figure 2C).

Establishment of a BALB/c-J774 leukaemia model. After determining that CasNa inhibits the proliferation of J774 cells, and reduces cell viability, as does anti-neoplastic Ara-C, we developed a murine leukaemia model with this cell line to evaluate the antileukaemic potential of CasNa. Our results show that animals (female or male BALB/c mice) challenged with J774 cells developed major splenomegaly,

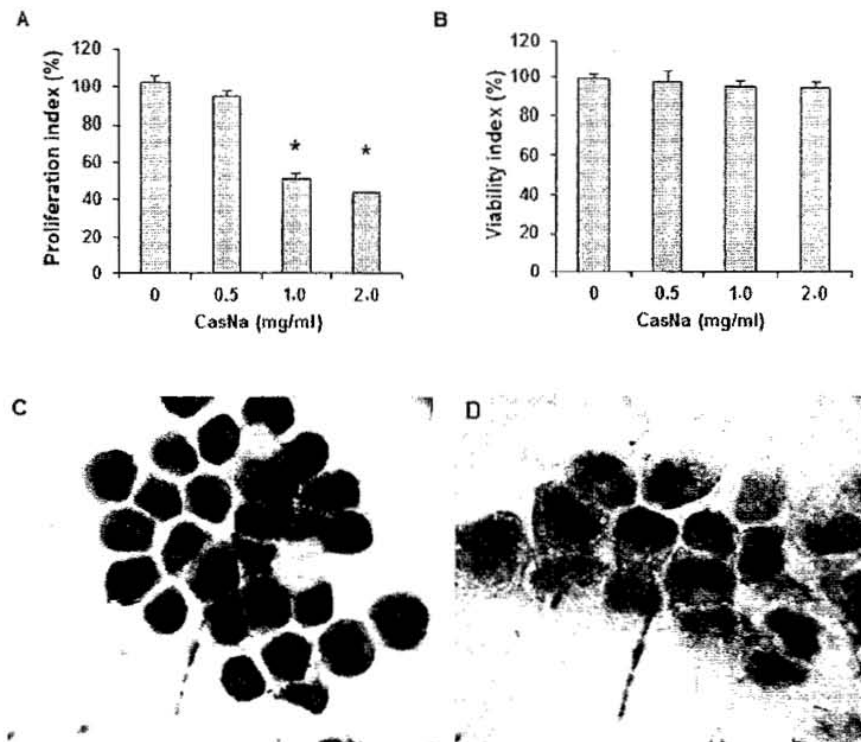


Figure 1. Proliferation (A) and viability (B) of J774 cells in the presence or absence of CasNa. Each point represents the mean \pm standard deviation of at least three independent assays. ANOVA Tukey test, * $p < 0.05$. C: Representative images showing differentiation of J774 cells in the absence and presence of 2 mg/ml of CasNa (J774+PBS and J774+CasNa, respectively). Wright stain, $\times 100$.

hepatomegaly and solid tumours (Figures 3A-C), thereby resulting in the death of both female and male mice, before one hundred days (Figure 4).

CasNa reduces splenomegaly, hepatomegaly and tumour burden, while it increases the survival of mice inoculated with J774 cells. Leukaemia was induced using J774 cells as described previously, and our results show that treatment with CasNa significantly reduced splenomegaly, hepatomegaly and the presence of solid tumours (Figures 3A-C). We observed that all animals that were not treated with CasNa died before 100 days, while those treated with CasNa survived for a longer period, with 60% survival after 160 days in females and 50% survival in males. A Kaplan-Meier (log-rank) test was run and we found that the three treatments were significantly different ($p < 0.05$) between PBS vs. CasNa, PBS vs Ara-C or CasNa vs Ara-C. (Figures 4A and B). Overall, the increased survival of mice treated with CasNa, and the decreased splenic, liver and tumour index indicate that CasNa also inhibits the proliferation of J774 cells *in vivo*.

Mononuclear bone marrow cells isolated from mice that survived the inoculation of J774 cells treated with CasNa are unable to proliferate *in vitro* in the absence of rmlL3. We aimed to determine whether J774 cells persisted in BALB/c mice treated with CasNa that survived for 260 days. Therefore, we evaluated the proliferation of bone marrow MNCs derived from these mice compared with that of bone marrow cells from healthy mice. Our results show that the MNCs in the bone marrow of mice that survived the inoculation of J774 cells and were treated with CasNa are unable to proliferate *in vitro* in the absence of rmlL3 (Figure 3D). Therefore, our results suggest that CasNa induces cure of J774 leukaemia macrophage-like cell-induced leukaemia in surviving mice.

Discussion

One of the major problems concerning improved AML therapy is the long-term, low rate of disease-free survival (12); the scenario is worsened if the patient is over 65 years

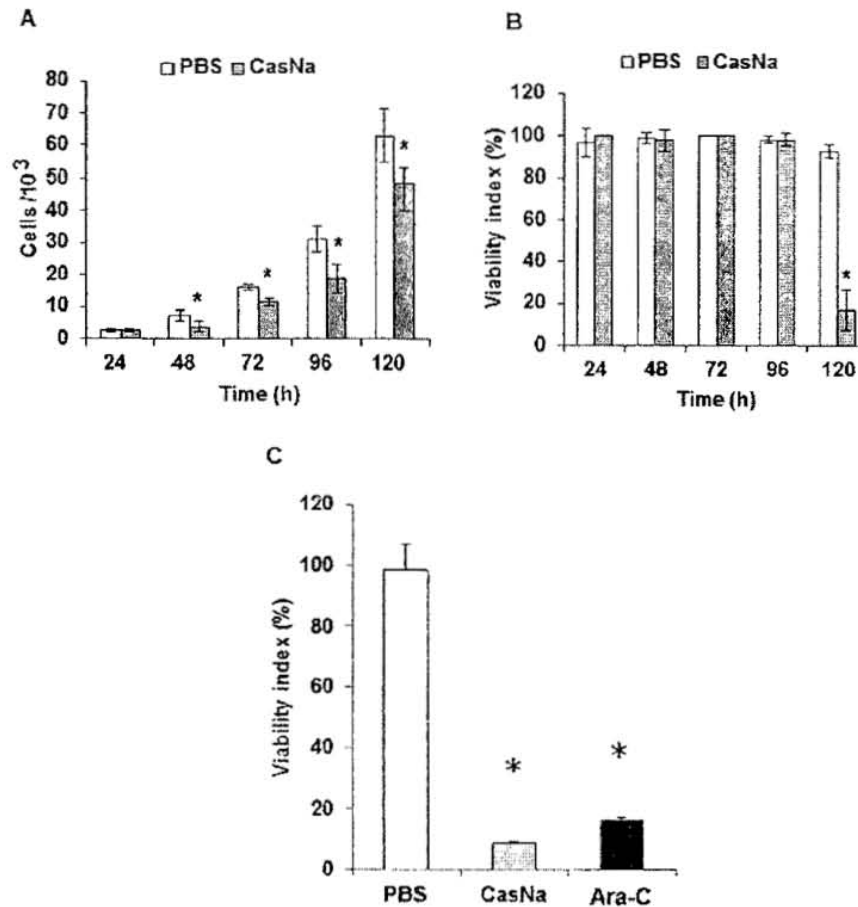


Figure 2. Proliferation (A) and viability (B) of J774 cells at 24-h intervals in the absence or presence of 2 mg/ml CasNa (PBS or CasNa respectively). (C) Viability index of J774 cells in the presence and absence of 2 mg/ml CasNa or Ara-C in 120 h culture. Each point represents the mean \pm standard deviation of at least three independent assays. ANOVA Dunnet test, * $p < 0.05$.

of age, when intensive treatments are poorly tolerated or induce rapid death (13). Furthermore, after a course of chemotherapy for AML with epipodophyllotoxins and antiracemylines, it has been found that patients develop secondary leukaemias, particularly the M5 FAB subtype of AML or acute monocytic leukaemia (14).

Our recent studies have shown that CasNa, a casein salt, reduces the proliferation of various leukaemia cell lines, (but not normal hematopoietic cells) *in vitro* while promoting granulopoiesis in healthy mice *in vivo* (15). Although we found that CasNa reduces the proliferation of leukaemia cells, it was uncertain whether prolonging the exposure time also affected viability and differentiation, two key elements in the physiology of leukaemia cells closely associated with malignant growth (16).

Previously, we observed an increase in monocytic differentiation by 72 h which did not negatively affect viability. Notably, by increasing the treatment time to 120 h, cell viability dropped to 80%. However, we consider it important to clearly identify the transition of J774 monoblastic cells to fully-differentiated and functional J774 monocyte-macrophage, therefore, in the future, we aim to analyze whether differentiation is associated with a specific induction of the cell death path.

The establishment of murine leukaemia models using leukaemia cell lines is considered ideal for the study of possible therapeutic drugs (17). Unfortunately, although monocytic leukaemia is the most common subtype among secondary leukaemias (14) and is difficult to treat, and few monocytic leukaemia models have been reported (10, 11, 18).

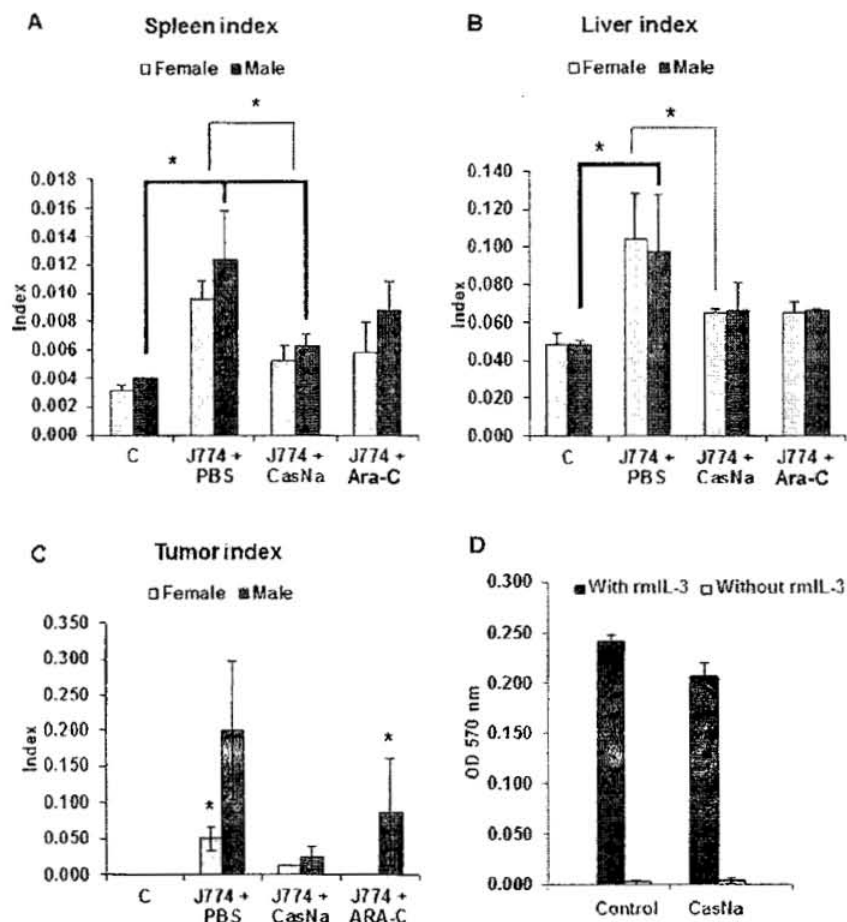


Figure 3. Splenic (A) hepatic (B) and tumoral (C) index of female and male BALB/c mice intraperitoneally inoculated with 1×10^6 J774 cells. Each point represents the mean \pm standard deviation of at least three independent assays. (D) Proliferation of mononuclear cells of bone marrow of BALB/c mice, control or surviving BALB/c mice inoculated with J774 cells and treated with CasNa, with and without 5 ng/ml of rmlL3. Representative assay. ANOVA Dunnett test, $^*p < 0.05$.

Therefore, we evaluated whether the inoculation of J774 monocytic leukaemia cells (19) generated from the murine BALB/c, induced macrophage tumours, as reported by others (10, 11).

Injection of this cell line *i.p.* into both male and female mice proved to be lethal, and all mice displayed similar symptoms, despite the gender of the animals. This appears to contrast with the incidence of monocytic leukaemia with little differentiation (M5a) in which there is a greater tendency for patients to be male (males: 57%, females: 43%) (14). However, considering the time point of the first symptoms, our results suggest that males are more likely to develop the disease earlier than females; in this sense, we wonder if CasNa could prolong survival in a scenario of

worst disease. Males treated with CasNa had extended survival compared to those that were not treated or to animals that received Ara-C, which has been used as an anti-neoplastic control in *in vivo* models (11). Our data are consistent with the work of Castano *et al.*, in which mice inoculated with J774 cells, either untreated or treated with anti-neoplastic cyclophosphamide, had similar survival curves, and in all cases the mice died (10). Interestingly, the prolonged survival of leukaemic mice *via* CasNa treatment is considered as evidence of growth inhibition of leukaemia cells *in vivo* (20).

A common problem with leukaemia treatment is the presence of minimum residual disease responsible for relapse (21); the problem is exacerbated with the M5 subtypes, which

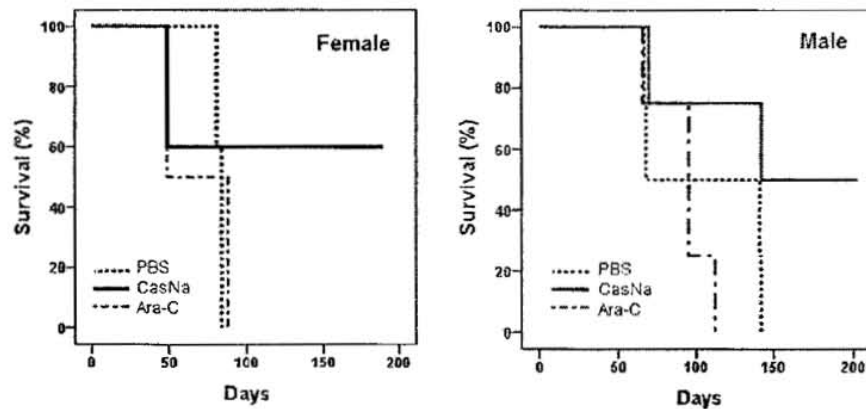


Figure 4. Survival curve of BALB/c mice treated with PBS, CasNa (10% w/v) or Ara-C every 48 h. Kaplan-Meier (Log rank) test shows CasNa statistical difference with respect to PBS $p < 0.05$

have high incidence in secondary leukaemias (22). No specific surface marker of J774 cells has yet been reported, however, the presence of residual malignant cells in the bone marrow can be established by assessing *in vitro* proliferation in the absence of growth factors (23). Interestingly, when we cultivated MNCs isolated from surviving mice inoculated with J774 and treated with CasNa, we found no evidence of MNCs that were capable of autonomous proliferation. Because cell proliferation in the presence of rmlL3 was similar in healthy mice and leukaemia survivors, these data suggest that CasNa treatment may be a curative alternative in this macrophage tumour model.

While it is clear that CasNa promotes survival, the mechanisms of *in vivo* antileukaemic action are unknown. In this regard, recently, we observed that *i.p.* administration of CasNa into healthy mice induces the production of cytokines in both the plasma and bone marrow (15); therefore, the antitumour properties described herein would seem to result from the massive induction of inflammatory cell migration into the peritoneal cavity (24) either *via* bioactive components of CasNa (25) or the secretion of growth factors, or differentiation or inflammatory systemic action (26). Additionally, we believe that CasNa must activate mechanisms beyond a simple inflammatory process because although other agents, such as zymosan or thioglycollate, increase the levels of proinflammatory cytokines (IL1 β , TNF- α , MIP2 and MCP-1/CCL2) (27, 28), they have no inhibitory effect on proliferation of hematopoietic leukaemic cells. On the other hand, CasNa also promoted normal haematopoiesis in healthy mice, representing a suitable therapeutic framework in which leukaemic cells are reduced, and favouring the immune response, such as granulopoiesis, to counter the leukemia cells.

In conclusion, CasNa prolongs the survival of mice that were lethally-inoculated with J774 cells, which represents clear evidence of antileukaemic activity.

Acknowledgements

We would like to thank MSc Armando Cervantes Sandoval for his assistance, and Mr. Ernesto J. Rivera Rosales for excellent technical assistance. We are indebted to CONACYT for a Ph.D. scholarship to CGY (169059) and LME (48959); as well as a Master's scholarship to ASI (246179). This work was supported in part by Fondo SEP-CONACYT (grant 104025) and PAPIIT (grant IN225610 and IN220814).

References

- Gregory TK, Wald D, Chen Y, Vermaat JM, Xiong Y and Tse W: Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukaemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol* 2: 23-33, 2009.
- Fung H, Shepherd JD, Naiman SC, Barnett MJ, Reece DE, Horsman DE, Nantel SH, Sutherland HJ, Spinelli JJ, Klingman HG and Phillips GL: Acute monocytic leukemia: A single institution experience. *Leuk Lymphoma* 19: 259-265, 1995.
- Bennett JM, Young ML, Andersen JW, Cassileth PA, Tallman MS, Pajetta E, Wiernik PH and Rowe JM: Long-term survival in acute myeloid leukemia. *Cancer* 80: 2205-2209, 1997.
- Bennett J and Begg C: Eastern Cooperative Oncology Group study of the cytochemistry of adult acute myeloid leukemia by correlation of subtypes with response and survival. *Cancer Res* 41: 4833-4837, 1981.
- Pui CH, Relling MV, Rivera GK, Hancock ML, Raimondi SC, Heslop HE, Santana VM, Ribeiro RC, Sandlund JT, Mahmoud HH, Evans WE, Crist WM, and Krance RA: Epipodophyllotoxin-related acute myeloid leukemia: A study of 35 cases. *Leukemia* 9: 1990-1996, 1995.
- Bernard-Marty C, Mano M, Pacsmans M, Accettura C, Munoz-Bermeo R, Richard T, Kleiber K, Cardoso F, Lobelle JP.

- Larsimont D, Piccart MJ and Di Leo A: Second malignancies following adjuvant chemotherapy: 6-year results from a Belgian randomized study comparing cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) with an anthracycline-based regimen in adjuvant treatment of node-positive breast cancer patients. *Ann Oncol 14*: 693-698, 2003.
- 7 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.
 - 8 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.
 - 9 Ramos-Mandujano G, Weiss-Steider B, Melo B, Cordova Y, Ledesma-Martinez E, Bustos S, Silvestre O, Aguiniga I, Sosa N, Martinez I, Sanchez L, Garcia A and Santiago-Osorio E: Alpha-, beta- and kappa caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D c13 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiology 213*: 133-141, 2008.
 - 10 Castano A, Mroz P, Wu M and Hamblin M: Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA 105*: 5495-5500, 2008.
 - 11 Tarnowski G, Ralph P and Stock C: Sensitivity to chemotherapeutic and immunomodulating agents of two mouse lymphomas and of a macrophage tumor. *Cancer Res 39*: 3964-3967, 1979.
 - 12 Tallman M, Gilliland D and Rowe J: Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood 106*: 1154-1163, 2005.
 - 13 Visani G, Pagano L, Pulsoni A, Tosi P, Piccaluga PP, Pastano R, Grafone T, Malagola M, Isidori A and Tura S: Chemotherapy of secondary leukemias. *Leuk Lymphoma 37*: 543-549, 2000.
 - 14 Tallman MS, Kim HT, Paicetta E, Bennett JM, Dewald G, Cassileth PA, Wiernik PH and Rowe JM: Eastern Cooperative Oncology Group. Acute monocytic leukemia (French-American-British classification M5) does not have a worse prognosis than other subtypes of acute myeloid leukemia: a report from the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol 22*: 1276-1286, 2004.
 - 15 Domínguez Melendez V, Silvestre-Santana O, Moreno-Fierros L, Aguiniga-Sanchez I, Martínez L, Marroquin-Segura R, García-Hernández AL, Weiss-Steider B, Marché-Cova A, Monroy-García A, Mora-García L and Santiago-Osorio E: Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis. *Inflamm Res 61*: 367-373, 2012.
 - 16 Hanahan D and Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell 7*: 57-70, 2000.
 - 17 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.
 - 18 Fujii SI, Hamada H, Fujimoto K, Shimomura T, and Kawakita M: Activated dendritic cells from bone marrow cells of mice receiving cytokine-expressing tumor cells are associated with the enhanced survival of mice bearing syngeneic tumors. *Blood 93*: 4328-4335, 1999.
 - 19 Kasukabe T, Okabe-Kado J, Honma Y and Hozumi M: Production by undifferentiated myeloid leukemia cells of a novel growth-inhibitory factor(s) for partially differentiated myeloid leukemic cells. *Jpn J Cancer Res 78*: 921-931, 1987.
 - 20 Lasek W, Feleszko W, Golab J, Stoklosa T, Marczak M, Dabrowska A, Malejezyk M and Jakobisiak M: Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in mice. *Cancer Immunol Immunother 45*: 100-108, 1997.
 - 21 Van Stijn A, Feller N, Marjoleine A, vander Pol, Gert J, Ossenkoppele, and Schuurhuis G: Minimal residual disease in acute myeloid leukemia is predicted by an apoptosis-resistant protein profile at diagnosis. *Clin Cancer Res 11*: 2540-2546, 2005.
 - 22 Ayesh M, Khassawneh B, Matalkah I, Alawneh K and Jaradat S: Cytogenetic and morphological analysis of de novo acute myeloid leukemia in adults: a single center study in Jordan. *Balkan J Med Genet 15*: 5-10, 2012.
 - 23 Gidali J, Feher I, Megyeri A and Kovacs P: Leukaemogenic potency of WEHI-3B cells grown *in vitro* or in leukaemic mice. *Bone Marrow Transplantation 28*: 699-704, 2001.
 - 24 Passori D, Mazzone A, Lecchini S and Frigi G: The effect of opioid peptides of peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Med Farmacol 15*: 71-80, 1993.
 - 25 Russell M, Brooker B 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.
 - 26 Noursadeghi M, Bickerstaff M, Herbert J, Moyes D, Cohen J and 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.
 - 27 Chadzinska M, Maj M, Scisłowska-Czarnecka A, Przewłocka B and Plytycz B: Expression of proenkephalin (PENK) mRNA in inflammatory leukocytes during experimental peritonitis in Swiss mice. *Pol J Pharmacol 53*: 715-718, 2001.
 - 28 Matsukawa A, Kudo S, Maeda T, Numata K, Watanabe H, Takeda K, Akira S and Ito T: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J Immunol 175*: 3354-3359, 2005.

Received April 18, 2014

Revised June 1, 2014

Accepted June 2, 2014