



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Efecto sinérgico del caseinato de sodio combinado
con citarabina o daunorrubicina en la eliminación
de células leucémicas WEHI-3.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Frida Montserrat Meléndez Ibarra

Director de tesis:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Ciudad de México, Agosto, 2019.





Universidad Nacional
Autónoma de México



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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **MELÉNDEZ IBARRA FRIDA MONTSERRAT**, con número de cuenta **311132157**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **20 de agosto de 2019** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

Alvarez Barrera Lucila

VOCAL Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

[Firma]

SECRETARIO Dra. YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ

Yolanda Cordova Galaviz

SUPLENTE Dr. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

Edgar Ledesma Martinez

SUPLENTE Dra. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

[Firma]

El título de la tesis que presenta es: **Efecto sinérgico del caseinato de sodio combinado con citarabina o daunorrubicina en la eliminación de células leucémicas WEHI-3.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 21 de junio de 2019

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR

DIRECCIÓN

Vº. BO.

Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

APOYOS FINANCIEROS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, de la Unidad de Investigación de Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, UNAM.

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por ser guía y apoyo incondicional durante mi estancia en el laboratorio, por brindarme la confianza de pertenecer a su grupo de trabajo y por las oportunidades y experiencias que me brindó.

A la Dra Itzen Aguiñiga Sánchez por compartir sus conocimientos, tiempo y paciencia siempre que lo necesité. Por el apoyo experimental y teórico. Y sobre todo por la parte humana y los valores que mantenía en el laboratorio.

A la M. en C. Rocío Rivera, a la Dra. Sandra Salazar, a la M. en C. Guadalupe Gómez, al M. en C. Luis Martínez y al Dr. Edgar Ledesma, que me enseñaron todo lo que sé sobre hacer investigación y pertenecer a un equipo. Gracias por siempre hacerme sentir parte del laboratorio, su confianza y su apoyo para la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos (Sac, Elsa, Diego, Gaby, Gus, Luis, Malu, Jair, Lalo, Lamba y Mich) por su ayuda los experimentos, análisis y presentaciones de este trabajo, porque no importando que tan larga fuese la jornada de trabajo, siempre me brindaron su disposición, buen humor y amistad.

A todo el laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, mi familia científica, por todo su cariño y buenos momentos.

A los miembros del jurado:

Dra. Lucila Álvarez Barrera

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Dra. Yolanda Córdova Galaviz

Dr. Edgar Ledesma Martínez

Dra. Itzen Aguiñiga Sánchez

Por sus aportaciones y recomendaciones en este trabajo.

Al bioterio de la FES-Zaragoza, UNAM, por brindar los espacios y proveer los animales para que este trabajo se llevara a cabo. En especial a la M.V.Z. Adriana Altamirano Bautista y al M.V.Z. Román Hernández Meza por su apoyo.

DEDICATORIAS

A mis dos mejores amigos, Margarita y Javier, por ser los pilares de mi vida. Gracias a ustedes soy lo que soy ahora, mis logros siempre serán los suyos.

A mi mamá, el mejor ejemplo de una mujer asombrosa, gracias por ser mi ejemplo a seguir y nunca dejarme sola. Siempre me enseñaste que mis metas no tenían límites, y creíste en mí hasta en momentos dónde yo dejé de hacerlo. Me llenaste de amor y al mismo tiempo me hiciste fuerte.

A mi papá, el hombre más noble que conozco, gracias porque no hubo un día en el que no aprendiera algo de ti. Me enseñaste a ser la mejor versión de mí misma, me hiciste sentir segura y nunca pusiste en duda mis capacidades, siempre te voy a admirar.

Gracias a ambos, nunca podré pagarles todo lo que me han dado, lo feliz que he sido, ni expresarles todo el amor que les tengo.

A mi abuela Lupita por el cariño, los cuidados, la rebeldía, los buenos momentos y el ejemplo de fortaleza.

A mis abuelos Berta † y Eusebio †, aunque ya no estén físicamente, siempre estuvieron presentes a través de las historias y el amor que compartieron con los demás.

A mis tías, tíos, primos y sobrinos. A los grandes, por ser mi ejemplo a seguir y demostrarme que se puede superar cualquier obstáculo si lo deseas y trabajas por ello. A los más pequeños, que me recuerdan siempre las cosas buenas e importantes de la vida, aprender y ser feliz.

A mis amigos de toda la vida Euni, Irving y Xime, gracias por seguir a mi lado, aunque pasen los años, en los buenos y malos momentos siempre han estado ahí, espero que eso nunca cambie.

A Nona y a Lili, amigas indispensables en mi vida, siempre es bueno tener a tu lado mujeres inteligentes e independientes, ustedes son más que eso.

A mis amigos de la Universidad, JF (Bety, Brian, Carlitos, Diego, Fede, Isaí, Jael y Mili) que me hicieron pasar momentos increíbles en las prácticas de campo y salones de clases, gracias a ustedes sobreviví toda una carrera universitaria.

A Diego, gracias por ser mi compañero de aventuras, compartir tu felicidad y apoyarme siempre.

A la UNAM por ser mi segunda casa, y a todas las personas que me permitió conocer.

A todos los ratones que fueron sacrificados en nombre de la ciencia, esperando que un día, prescindamos de ustedes.

“Omni cellula e cellula “

-Robert Virchow, 1855.

ÍNDICE

1.	LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	ix
2.	LISTA DE ABREVIATURAS	xii
3.	RESUMEN	1
4.	INTRODUCCIÓN	3
5.	MARCO TEÓRICO	5
	a. HEMATOPOYESIS	
	b. MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO	
	c. REGULADORES HEMATOPOPYÉTICOS	
	d. LEUCEMIA	
	e. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA	
	f. CLASIFICACIÓN	
	g. DIAGNÓSTICO Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	
	h. TRATAMIENTO	
	i. CASEINA Y LEUCEMIA	
	j. CASEINATO DE SODIO	
6.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
7.	JUSTIFICACIÓN	24
8.	HIPÓTESIS	25
9.	OBJETIVOS	26
10.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
11.	RESULTADOS	32
12.	DISCUSIÓN	48
13.	CONCLUSIONES	56
14.	BIBLIOGRAFÍA	57

1. Lista de tablas y figuras

Figura 1 Cascada hematopoyética.

Figura 2 Localización del nicho hematopoyético.

Figura 3 Esquema de mutaciones asociadas a la aparición de LMA.

Figura 4 Efecto del CS inoculado vía *i.p.* a un ratón sano BALB/c.

Figura 5 Curvas de proliferación de células WEHI-3 tratadas con diferentes dosis de CS (A), citarabina (B) y daunorrubicina (C).

Figura 6 Proliferación de células WEHI-3 estimuladas con IC₂₅ e IC₅₀ de citarabina, daunorrubicina y CS, solos o en combinación.

Figura 7 Proliferación de células mononucleadas de médula ósea (CMN de MO) de ratón BALB/c estimuladas con IC₂₅ e IC₅₀ de citarabina, daunorrubicina y CS, solos o en combinación.

Figura 8 Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con diferentes dosis de caseinato de sodio (CS). Análisis de Kaplan Meier.

Figura 9 Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con diferentes dosis de citarabina.

Figura 10 Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con diferentes dosis de daunorrubicina.

Figura 11 Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con daunorrubicina, citarabina, CS o combinados.

Figura 12 Proliferación células mononucleadas ratones leucémicos a los 30 días post inducción y tratamientos, en ausencia o presencia de rML-3.

Figura 13 Proliferación células mononucleadas ratones leucémicos sobrevivientes a los 60 días post inducción y tratamientos, en ausencia o presencia de rML-3.

Figura 14 Propuesta de mecanismo de acción del tratamiento combinado CS-dauno.

Tabla 1 Clasificación de las Leucemias.

Tabla 2 Clasificación en grupo de riesgo de acuerdo al perfil citogenético y molecular.

Tabla 3 Esquema de tratamiento para la LMA.

Tabla 4 Dosis media de inhibición del caseinato de sodio, citarabina y daunorrubicina en células WEHI-3.

Tabla 5 Comparativa de los datos esperados versus los obtenidos experimentalmente al combinar los fármacos de citarabina y daunorrubicina que revelan efecto sinérgico.

Tabla 6 Porcentaje de supervivencia a los 40 y 60 días de tratamiento después de la inducción de la LMA.

Tabla 7 Análisis cualitativo de la fragilidad ósea de los ratones a los 30 días de tratamiento después de la inducción.

Tabla 8 Cultivo de MO en ausencia y presencia de rML-3 para observar diferenciación y formación de colonias de granulocitos.

2. Lista de abreviaturas

CAG	régimen de citarabina, aclarubicina y G-CSF
CD	antígenos de superficie celular
Cita	citarabina
CMN	células mononucleadas
CMN de MO	células mononucleadas de médula ósea
CS	caseinato de sodio
CSDMs	células supresoras derivadas de mieloides
Dauno	daunorrubicina
Eo	eosinófilos
EPO	eritropoyetina
FAB	grupo Franco-Americano-Británico
FCEV	factor de crecimiento endotelial vascular
FLT3	tirosina cinasa relacionada a fms
G-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
HSC	célula troncal hematopoyética (por sus siglas en inglés)
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
IL-	interleucina
IMDM	medio dulbecco modificado por iscove
LA	leucemia aguda
LMA	leucemia mieloide aguda
LMC	leucemia mieloide crónica
LLA	leucemia linfoide aguda
LLC	leucemia linfoide crónica

LT	linfotoxina
M-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos
MO	médula ósea
MPO	mieloperoxidasa
NMP	neoplasia mieloproliferativa previamente diagnosticada.
OMS	organización mundial de la salud
PBS	solución estabilizadora de fosfatos
PLC	progenitor linfoide común
PLM	progenitor mieloide común
PML	leucemia promielocítica aguda
RC	remisión completa
rmIL-3	interleucina 3 recombinante de ratón
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
FCT	factor de células troncales
SFB	suero fetal bovino
SMD	síndrome mielodisplásico previamente diagnosticado
SP	sangre periférica
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta
TGF-α	factor de necrosis tumoral alfa
TPO	trombopoyetina
Tregs	células T reguladoras
UFC-Emeg	unidad formadora de colonias de eritrocitos-megacariocitos
UFC-GEMM	unidad formadora de colonias granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos
UFC-GM	unidad formadora de colonias granulocitos-macrófagos
μL	microlitro

3. RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA), por más de 40 años, ha sido tratada con el esquema de citarabina más una antraciclina como la daunorrubicina (llamado 7+3) y recientemente se aprobó su versión liposomal llamada CPX-351 que proporciona una administración controlada con dosis más pequeñas y frecuentes, sin embargo, a pesar de los intentos por mejorar la terapia contra la LMA, no se ha logrado impactar en la sobrevivencia a largo plazo. En estudios realizados por nuestro equipo de trabajo, se descubrió que el caseinato de sodio (CS), una sal derivada de la caseína, tiene propiedades antiproliferativas *in vitro* en las líneas celulares leucémicas como J774, P388 y WEHI-3. Administrada vía intraperitoneal es reguladora de la hematopoyesis promoviendo la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), mientras que en los ratones leucémicos inducidos con células WEHI-3 prolonga la sobrevivencia, sin embargo al cultivar la MO de estos ratones sobrevivientes después del tratamiento aún prevalecen las células blásticas auto proliferantes, evidencia que la leucemia prevalece a pesar del tratamiento y la sobrevida. En este trabajo se analiza si la combinación de CS con citarabina o daunorrubicina ayuda en la erradicación de la leucemia en modelos de ratón. Los resultados indican que al combinar el CS con la citarabina o la daunorrubicina se presenta un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación en un cultivo de células WEHI-3, y por el contrario al estimular un cultivo *ex vivo* de células mononucleadas de médula ósea de ratón normal con estas mismas combinaciones, la proliferación inducida por rmlL-3 es revertida por cita, dauno o la combinación, excepto el CS que induce la proliferación, incluso la combinación de CS-cita o CS-dauno revierte el efecto antiproliferativo de cita o dauno. Al administrar las combinaciones del CS con la citarabina o la daunorrubicina para tratar a ratones leucémicos inducidos con la línea celular WEHI-3, el 20 % logró una sobrevida por más de ocho meses con la combinación CS-daunorrubicina, en comparación con los que fueron tratados con

el esquema convencional (citarabina-daunorrubicina) que sólo sobrevivieron hasta 50 días o los que no fueron tratados que sobrevivieron tan solo 35. A los 30 días la MO de los ratones leucémicos tratados con o sin combinación presenta células autoproliferantes por tanto de LMA esta invadiendo la médula ósea. Al día 60 ya no están presentes en la combinación CS-dauno o CS-cita. Interesantemente, por el contrario la combinación CS-dauno mas rmlL-3 elevó la diferenciación y la proliferación de estas células comparado con las de un ratón sano. Los tratados con la combinación CS-citarabina tampoco mostraban de LMA sin embargo no proliferan en presencia de Interleucina 3, lo que pone en evidencia daño a las células normales de la MO. Esto demuestra que el tratamiento con CS-daunorrubicina prolonga la sobrevida y puede llegar a erradicar la enfermedad, lo cual puede considerarse como una futura alternativa para combatir la LMA, más efectiva que la combinación actual.

4. INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide aguda (LMA) son un grupo de enfermedades heterogéneas que se caracterizan por un desorden clonal de progenitores mieloides (Fernández, 2017), a pesar de décadas de investigación dedicadas al entendimiento de las características clínicas y biológicas de este grupo de enfermedades (Papaemmanuil *et al.*, 2016), los tratamientos para combatirla no han tenido un avance significativo que permita aumentar drásticamente la esperanza de vida (American Cancer society, 2019). La LMA es la leucemia aguda con mayor incidencia en adultos, representa aproximadamente el 80% de este grupo (Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016). Está caracterizada por una serie de mutaciones en genes involucrados en la proliferación y diferenciación hematopoyética, lo que la vuelve una enfermedad heterogénea. Para casi todos los subtipos de LMA, la quimioterapia de inducción está basada en antraciclinas combinadas con citarabina (Ara-C) si los pacientes se consideran candidatos para los enfoques intensivos (Megías-Vericat *et al.*, 2019). Si no es así los pacientes con un mal pronóstico deberán recurrir a terapias secundarias adicionales o a la suspensión de la antraciclina debido a la citotoxicidad de esta. Aún con el desarrollo de inhibidores, anticuerpos monoclonales y la versión liposomal de la combinación citarabina-daunorrubicina llamado CPX-351 la sobrevida a largo plazo es reducida en un gran porcentaje de los pacientes (Lancet *et al.*, 2018).

El caseinato de sodio (CS), una sal derivada de la caseína, posee la capacidad de inhibir la proliferación de líneas celulares leucémicas como J774, P388 y WEHI-3. (Ledesma-Martínez *et al.*, 2013). También promueve la producción de reguladores hematopoyéticos, la supervivencia de ratones leucémicos y atenúa las manifestaciones de la enfermedad administrado vía *i.p.* (Domínguez *et al.*, 2012; Santiago-Osorio *et al.*, 2015; Córdova-Galaviz, 2014). A pesar de esto, no es capaz de eliminar las células leucémicas de la médula ósea (MO) en su totalidad (Ledesma, 2013). En este trabajo se analiza el efecto de las combinaciones del CS con la citarabina o la daunorrubicina sobre la línea celular WEHI-3 y las células

mononucleadas (CMN) de MO de ratón sano y también en ratones leucémicos y prevalencia de la leucemia.

5. MARCO TEÓRICO

a. Hematopoyesis

La hematopoyesis es un proceso jerárquico complejo por el cuál las células troncales hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) dan origen a las células sanguíneas maduras (Mayani *et al.*, 2007); mismas que cumplen diversas funciones fundamentales como el transporte de oxígeno en el cuerpo o la constitución del sistema inmunológico para la defensa del organismo contra agentes patógenos (Argüelles, 2009). Debido a que las células sanguíneas maduras son predominantemente de vida corta, se requieren células troncales durante toda la vida para reponer los progenitores multilinaje y los precursores comprometidos con los linajes hematopoyéticos individuales, de tal forma, la diferenciación de las células hematopoyéticas inicia en la fase embrionaria y deriva del mesénquima primitivo en el saco vitelino y de la región aorta-gonada-mesonefro (AGM) seguido por la placenta, hígado fetal, bazo y médula ósea (MO) (Mikkola *et al.*, 2006). Las HSC residen como células raras en la MO que es un tejido que reside en las trabéculas del hueso esponjoso en mamíferos adultos (Lichtman *et al.*, 2005), y se ubican en la cima de una jerarquía de progenitores que producen precursores sanguíneos dedicados a la diferenciación y conformación de células sanguíneas maduras, incluidos eritrocitos, megacariocitos, células mieloides (monocitos/macrófagos y neutrófilos), linfocitos y plaquetas. Al igual que con todas las demás células troncales, las HSC son capaces de auto-renovarse, aunque esta capacidad disminuye a lo largo de la vida (Orkin, 2008).

Para una mayor claridad en la presentación de la hematopoyesis esta se dividió en cuatro compartimientos: troncal, progenitor, precursor y terminal (Argüelles, 2014). En el compartimiento troncal encontramos a las células que aún no tienen un linaje o estirpe determinado, llamadas irrestrictas. Como son las HSC, las unidades formadoras de colonias de blastos (UFC-BL) y las unidades formadoras de colonias linfocitoide/mielocitoide (UFC-LM). Estas últimas son las que dan origen a las células

restringidas, llamadas progenitor linfoide común (PLC) y progenitor mieloide común (PMC). Las PLC dan lugar a las unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos (UFC-GEMM), estas células al igual que sus antecesoras tienen la capacidad de autorrenovarse y migrar. Este grupo sólo representan el 0.1% del total de células en la MO de un individuo y son las responsables de la renovación a largo plazo. En el compartimiento progenitor que corresponde a >0.5%, las células han perdido su capacidad de autorrenovarse y se dedican a seguir una línea de diferenciación, aquí podemos encontrar a las unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (UFC-GM), eritrocitos-megacariocitos (UFC-EMeg) y a sus descendientes las células progenitoras UFB-E, UFC-E, UFC-M, UFC-G, UFB-Meg, UFC-Bas, UFC-Eo, UFC-LB y UFC-LT(Figura 1) . En el compartimiento precursor las células ya son reconocibles por su morfología y constituyen el >90% de las células de la MO, así tenemos a los proeritroblastos, monoblastos, mieloblastos, megacarioblastos, linfoblastos. Finalmente, en el compartimiento terminal están las células maduras y funcionales: eritrocitos, monocitos/macrófagos, neutrófilos, plaquetas, basófilos/mastocitos, eosinófilos, linfocitos T y B (Argüelles 2014; Mayani *et al.*, 2007).

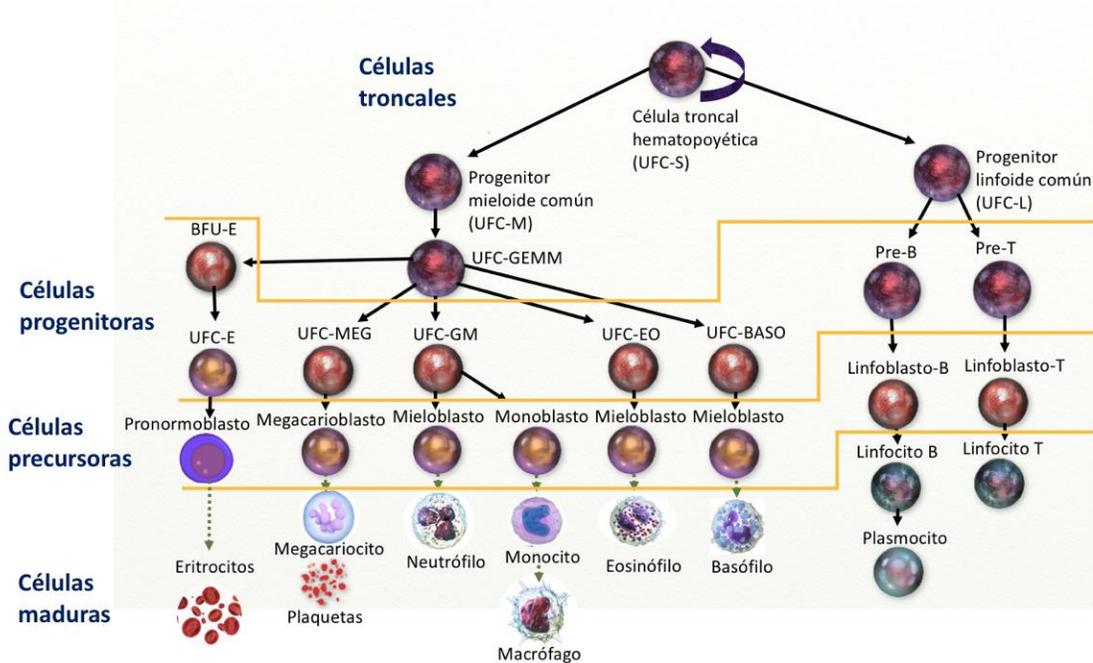


Figura 1. Cascada hematopoyética. Se indican las células correspondientes a los compartimientos hematopoyéticos: troncal, progenitor, precursor y terminal (Tomado y modificado de Pantoja *et al.*, 2015)

El proceso de hematopoyesis se ha conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados, y a través de la manipulación de modelos animales (ratón y pez cebra), se ha complementado y ampliado los estudios sobre la hematopoyesis humana. (Orkin, 2008). El estudio de la producción de células sanguíneas se ha tornado un ejemplo de la manera en que pueden organizarse y regularse otros tejidos. Las investigaciones básicas en la hematopoyesis que incluyen definir los cambios moleculares graduales que acompañan a cambios funcionales en las células en maduración, la agrupación de células en subgrupos funcionales y la demostración de la regulación de células madre hematopoyéticas por el microentorno especializado, son conceptos que han nacido en la hematología, pero que pueden servir de modelos para otros tejidos (Scadden *et al.*, 2016). El conocimiento sobre las propiedades regenerativas de las HSC humanas han traído como resultado terapias como el trasplante de médula ósea en pacientes humanos, para tratar una variedad de trastornos genéticos, estados adquiridos de insuficiencia de la médula ósea y cáncer (Orkin, 2008).

b. Microambiente hematopoyético

Para que el proceso de la hematopoyesis se lleve a cabo es necesario un ambiente específico denominado microambiente hematopoyético (MIH), este consiste en una estructura altamente organizada de células del estroma (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos), células accesorias (monocitos y linfocitos), y sus productos (matriz extra celular, citocinas, quimiocinas, etc.) que van a regular la localización y fisiología de las células hematopoyéticas (Mayani *et al.*, 1992).

El estroma es una capa de células adherentes, conformada en su mayor parte por fibroblastos estromales, una proporción menor de macrófagos y por diferentes tipos celulares como adipocitos y osteoblastos (Dorshkind, 1990) (Figura 2). El estroma constituye así el microentorno en el cual las células progenitoras hematopoyéticas se desarrollan y se diferencian (Arber *et al.*, 2013).

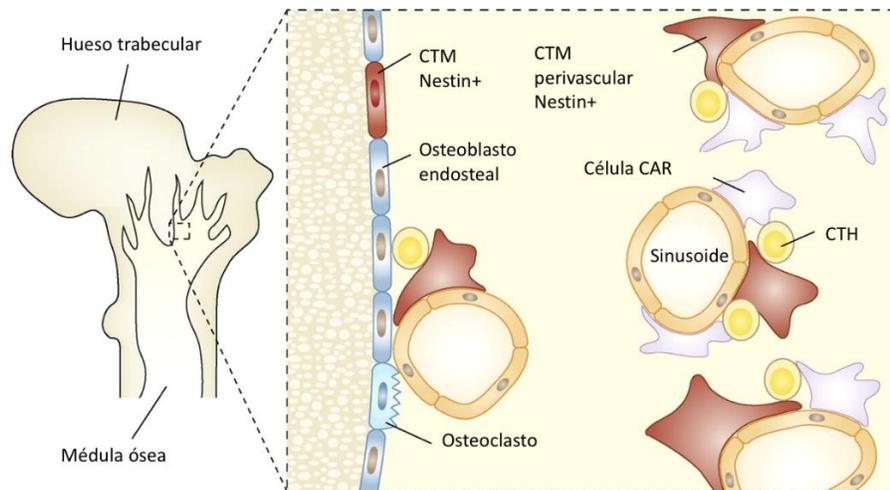


Figura 2. Localización del nicho hematopoyético. Las HSC están ubicadas en el endosteum, que está recubierto por osteoblastos y remodelado por osteoclastos. Estas células en conjunto con las células troncales mesenquimales o CTM perivasculares Nestin+ y las células CAR promueven el mantenimiento de HSC (Tomado y modificado de Ehninger & Trumpp, 2011).

Las células endoteliales se ubican en la superficie interna del sinusoides de la MO; controlan la entrada de sustancias químicas y partículas y expresan receptores para el factor de von Willebrand, colágeno tipo IV y laminina. El citoplasma de las células reticulares adventicias envuelve la pared externa del sinusoides, estas sintetizan fibras reticulares en donde descansan las células hematopoyéticas.

Los adipocitos tienen su origen, mediante lipogénesis, a partir de los fibroblastos. Son fuente de adiponectina, sustancia que inhibe la apoptosis de la célula endotelial, así como de leptina y osteocalcina, que promueven la granulopoyesis y osteogénesis e inhiben la linfopoyesis.

Las células estromales son las nodrizas de las células hematopoyéticas, ejecutan interacciones celulares inhibiendo la diferenciación mieloide y estimulando la secreción de osteopontina, que activa las células T.

Los osteoblastos secretan factores estimulantes de colonias de granulocitos, macrófagos, granulocitos-monocitos e interleucinas (IL) 1 y 6, así como factores inhibidores de la hematopoyesis (López, 2010).

c. Reguladores hematopoyéticos

El proceso de desarrollo y maduración de todas las células sanguíneas se rige por una serie de factores de transcripción y citocinas que promueven la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células troncales hematopoyéticas o células progenitoras (Metcalf, 1993; Orkin & Zon 2008). La identificación de los diversos tipos celulares se realiza de acuerdo a la expresión de marcadores de superficie. En este sentido, se ha caracterizado la expresión de diversos factores de transcripción que regulan el desarrollo y función de las HSC, así como la diferenciación de un linaje específico (Pantoja *et al.*, 2015). Una característica notable de los factores de transcripción en el sistema hematopoyético es que la mayoría está involucrada en translocaciones cromosómicas o con mutaciones somáticas en tumores malignos hematopoyéticos humanos (Orkin & Zon, 2008).

Las citocinas hematopoyéticas son una gran familia de ligandos extracelulares que están involucradas en la regulación de la hematopoyesis dentro de una compleja red de reguladores positivos y negativos. Algunas citocinas tienen especificidades de linaje muy estrechas de sus acciones, mientras que muchas otras tienen rangos de especificidad bastante amplios y superpuestos (Metcalf, 2008).

Algunas de las más relevantes en el control de la hematopoyesis son el factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF por sus siglas en inglés), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucinas, eritropoyetina (EPO) y trombopoyetina TPO. Hay una serie de otras citoquinas que ejercen efectos profundos en la formación y maduración de las células hematopoyéticas, que incluyen el factor de células troncales (FCT), el ligando flt-3 / flk-2 (FL) y el factor inhibidor de la leucemia (LIF). Otras citocinas o ligandos como jagged-1, factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) también juegan un papel importante en la modulación de la hematopoyesis (Metcalf, 2008).

Muchas de las citocinas son producidas por las células que conforman el microambiente hematopoyético. Por ejemplo, los fibroblastos estromales son capaces de sintetizar y secretar citocinas como la IL-1, 6, 7, 8, 11, M-CSF, G-CSF, el factor de crecimiento de células troncales (CSF) y el interferón-beta (IFN- β). En los osteoblastos, se ha corroborado la producción de G-CSF, GM-CSF, IL-6; así como se ha encontrado la expresión del factor inhibitorio de la leucemia (FIL), TNF- α , el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), TGF- β y linfotoxina TNF- β (LT) (Mayani *et al.*, 2007). El papel de los adipocitos en la hematopoyesis no es muy claro, se ha propuesto que promuevan la regeneración de las HSC y la hematopoyesis, y que su regulación sea a través de la secreción de leptina (Zhou *et al.*, 2017).

d. Leucemia

La leucemia es un tipo de cáncer en las células que componen la sangre. La mayoría de las veces, la leucemia se desarrolla de los glóbulos blancos, pero algunas leucemias comienzan en otros tipos de células sanguíneas. Existen varios tipos de leucemia, que se dividen principalmente en función de si la leucemia es aguda (de crecimiento rápido) o crónica (de crecimiento más lento), y si comienza en las células mieloides o en las células linfoides. (American Cancer Society, 2019).

Los tumores de origen hematopoyético se asocian a menudo con mutaciones que bloquean la maduración de la célula progenitora o que anulan su dependencia de los factores de crecimiento (Kumar *et al.*, 2015). Para que una célula se transforme en leucémica es un proceso complejo de múltiples pasos llamado leucemogénesis, que consisten en la acumulación de mutaciones que modifican en algún punto su sistema de señalización celular (receptor, segundo mensajero, proteína efectora o factor de transcripción) (Irons & Stillman, 1996) (Figura 3). El conjunto de estas modificaciones es una expansión clonal no regulada y alteraciones de los procesos de muerte celular y diferenciación (Renneville *et al.*, 2008).

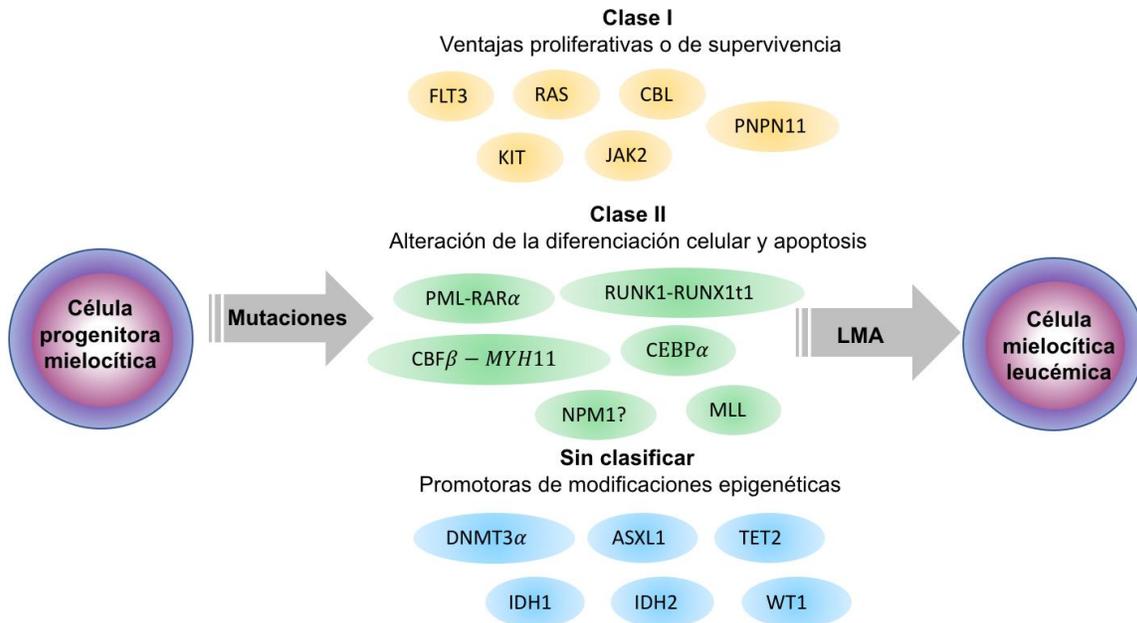


Figura 3. Esquema de mutaciones asociadas a la aparición de LMA. En modelo hipotético de los 2 *hits*, la LMA es consecuencia de la colaboración entre al menos 2 tipos de mutaciones. Tomado y modificado de Lagunas-Rangel 2016.

Las leucemias se dividen en tipos agudos y crónicos. Cuando los glóbulos blancos inmaduros o blastos proliferan, la presentación es generalmente aguda, mientras que las leucemias derivadas de células maduras tienden a ser crónicas (Monroya *et al.*, 2012). La leucemia crónica por lo general tiene un inicio insidioso, mientras que las leucemias agudas suelen manifestar un inicio abrupto. Además, las leucemias agudas (excepto las mieloides) tienen un pico de incidencia en niños de alrededor de dos a tres años; las leucemias crónicas tienden a tener una mayor incidencia en pacientes mayores (Rabbitts, 1991). Los leucocitos suelen ser de origen linfóide (Células T y B) o de origen mielóide (neutrófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos). Así, podemos resumir cuatro principales tipos de leucemia: leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielóide crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mielóide aguda (LMA) (Monroya *et al.*, 2012).

d.2. Clasificación

Las leucemias agudas (LA) son un grupo de padecimientos que suponen proliferación desordenada de una clona de células hematopoyéticas no funcionales. La falla de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a sobreproducción sin sentido de células incapaces de madurar y funcionar normalmente (Argüelles, 2011). Se pueden clasificar mediante su morfología, inmunología y citogenética. Según la clasificación de la Asociación Franco-Americano-Británica (FAB) morfológicamente hablando podemos distinguir dos estirpes: linfoide y mieloide, con tres tipos en el linaje linfoide (L1, L2, L3) y 8 en el linaje mieloide (M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las Leucemias. A) Clasificación leucemias agudas linfoblásticas, B) Clasificación de leucemias agudas mieloblásticas. Tomado y modificado de Ladines *et al.*, 2016. *De los casos totales de LMA

CLASIFICACIÓN				
A). Leucemias agudas linfoblásticas (LAL)	Frecuencia	Morfología	Inmunofenotipo	
L1: linfoblástica típica	Entre 25% y 30% de los casos en adultos y 80% en niños	Blastos homogéneos, núcleo irregular, cromatina homogénea.	B: CD19 CD22 CD79a CD10 CD20	T: CD3 CD7 CD5 CD2 CD4
L2: linfoblástica atípica	70% de los casos en adultos y 14% en niños	Núcleo irregular, cromatina heterogénea, nucléolo largo	B: CD19 CD22 CD79a CD10 CD20	T: CD3 CD7 CD5 CD2 CD4

L3: parecida al linfoma de Burkkit	Entre el 1% y 2% de los casos	Blastos grandes, nucléolo prominente, abundante citoplasma, abundantes vacuolación citoplasmática cubriendo el núcleo	B: CD19 CD22 CD79a CD10 CD20	T: CD3 CD7 CD5 CD2 CD4
<i>B). Leucemias agudas mieloblásticas (LMA)</i>	Frecuencia	Morfología	Inmunofenotipo	
M0: mieloblástica diferenciada mínimamente	Menos del 5% de las LMA en adultos	Se asemejan a los blastos de la LLA-L2, citoplasma basofílico no granular	CD13+ CD33+ CD11b+ CD11c+ CD14+ CD15+	
M1: mieloblástica inmadura		Blastos de tamaño medio con un núcleo grande, cromatina dispersa rodeando el nucléolo. Puede mostrar granulación azurofílica en el citoplasma	MPO+ CD13+ CD117+ CD34+/-	
M2: mieloblástica madura	30% de los casos totales de LMA*	Blastos de tamaño pequeño-mediano con núcleo grande, nucléolo redondeado ubicado en la orilla del citoplasma. El citoplasma es basofílico.	MPO+ CD34+/- CD15+ HLA-DR+/- CD117+/-	
M3: promielocítica hipergranular		Granulación azurofílica abundante e intensa. El núcleo es en apariencia monocítico, irregular o bilobulado	CD13+ CD33+ HLA-DR- CD34-	
M4: mielomonoblástica	20% *	Blastos grandes, núcleo moderado y basofilia variable. El núcleo puede ser redondo, con forma de riñón o circular. El nucléolo es usualmente prominente	CD13+ CD5+ CD33+ CD11b+ CD11c+ CD14+ CD64+ CD4+	
M5: monoblástica /monocítica	15% *	M5a: Blastos grandes con núcleo redondo y cromatina inmadura dispersa. M5b: Núcleo redondeado o con forma de riñón con menos citoplasma basofílico granulado con vacuolas	CD14+ CD68+ CD4+ CD11c+ HLA-dr+ Cd64+	

M6: eritroleucemia	Entre 5% y 6%*	Eritrocitos en forma de hongo, equinocitos espiculados y acantocitos. En la sangre periférica consisten en macrocitos, basófilos puntados, cuerpos de Howell-Jolly o anillos de cabot.	CD13+ CD33+ CD15+ Glycophorin A+ Glycophorin C+
M7: megacarioblástica	Entre 3% y 5%*	Blastos polimórficos inmaduros. El núcleo es excéntrico con cromatina reticulada y dispersa. Nucleólo prominente. El citoplasma no es granular, basofílico y muy similar en apariencia a las plaquetas, con pseudópodos o granulaciones. En la sangre periférica se observan micromegacariocitos y fragmentos de megacarioblastos.	CD41+CD61+ CD42+ CD13 CD33+ CD34+

e. Leucemia mieloide aguda

La leucemia mieloide aguda es la forma más común de leucemia aguda, con una incidencia que aumenta con la edad avanzada, 80% de los casos son adultos. Puede surgir en la MO, la sangre periférica o el tejido extra medular. Aunque generalmente es de etiología desconocida y puede presentarse como una enfermedad de Novo en individuos sin antecedentes de trastornos de la sangre (Kouchkovsky & Abdul, 2016), también puede desarrollarse después de la exposición a agentes genotóxicos (como una quimioterapia previa) o después de un trastorno hematológico anterior (por ejemplo, síndrome de insuficiencia de la médula o síndrome mielodisplásico). El trastorno surge en una célula troncal hematopoyética multipotencial transformada de manera maligna que adquiere alteraciones genómicas sucesivas, que finalmente evolucionan a una enfermedad clínicamente manifiesta. La LMA es una neoplasia maligna muy compleja, con una heterogeneidad genética, epigenética y fenotípica considerable (Löwenberg & Rowe, 2015).

Las alteraciones moleculares reflejan la fisiopatología de la LMA, son posibles dianas terapéuticas y también tienen valor predictivo. En esta enfermedad, la citogenética y la biología molecular ayudan a decidir la terapia postremisión con trasplante hematopoyético en primera remisión completa (RC) (Sierra, 2015).

El tamaño de los blastos en la LMA varía, pueden ser ligeramente más grandes que los linfocitos del tamaño de los monocitos o incluso más grandes. Los núcleos son grandes, de diversas formas y generalmente con varios nucléolos (Campos *et. al.*, 1989).

f. Clasificación

La clasificación de la LMA fue por mucho tiempo basada en la morfología (FAB) y el inmunofenotipo. Las primeras pruebas de la base genética de la LMA provienen del análisis citogenético, en el cual se detectaron cambios a nivel cromosómico como translocaciones, deleciones, inserciones, inversiones, monosomías, trisomías, poliploidías y o transaberraciones. Generalmente una o más anomalías citogenéticas son encontradas aproximadamente el 55% de los pacientes con LMA, y debido a esto configuran un fuerte factor pronóstico dentro de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Meyer *et al.*, 2014).

En la clasificación de la OMS, el término "mieloide" incluye todas las células pertenecientes a los linajes granulocíticos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocíticos / macrófagos, eritroides, megacariocíticos y mastocitos. Las características morfológicas, citoquímicas y / o inmunofenotípicas se utilizan para establecer el linaje de las células neoplásicas y para evaluar su maduración. Una neoplasia mieloide con 20% o más blastos en la sangre periférica (SP) o en la MO se considera leucemia mieloide aguda (LMA) cuando ocurre *de novo*, también evoluciona a LMA cuando ocurre en un síndrome mielodisplásico previamente diagnosticado (SMD) o neoplasia mielodisplásica / mieloproliferativa (SMD / NMP), o transformación blástica en una neoplasia mieloproliferativa previamente diagnosticada (NMP). Una proliferación tumoral de blastos en un sitio extramedular

también se considera LMA cuando se encuentra de novo o en un paciente con SMD o SMD / NMP, y la transformación blástica en casos de NMP (Mufti *et al.*, 2008).

En un enfoque jerárquico, los cambios genéticos tienen prioridad en la leucemia e inmunología mieloide aguda. Se reconocen cuatro grupos principales de leucemia mieloide aguda: 1) leucemia mieloide aguda con anomalías genéticas recurrentes, 2) leucemia mieloide aguda con displasia multilineaje, 3) leucemia mieloide aguda, relacionada con la terapia y 4) leucemia mieloide aguda no clasificada de otra manera. La leucemia bifenotípica se reconoce como una forma de leucemia aguda de linaje ambiguo (Brunner, 2003).

g. Diagnóstico y características clínicas

Existen muchos subtipos de LMA, y según su edad, perfil citogenético y molecular, la terapia de inducción dependerá de los pacientes en base a presentar síndrome febril, síndrome anémico, síndrome purpúreo y algunos pueden presentar dolor óseo. En las pruebas diagnósticas se debe realizar aspirado de MO, frotis de sangre periférica, citogenética y biología molecular para su adecuada clasificación. Para ser considerada LMA se requiere la presencia de blastos en 20% o más en la MO. También debe realizarse un inmunofenotipo donde el criterio empleado es 20% o más células leucémicas con expresión del marcador.

El estudio citogenético de las células leucémicas de la sangre periférica y/o de la médula ósea de los enfermos con LMA detecta alteraciones en alrededor del 60% de los casos. Es imprescindible el análisis citogenético convencional, en el diagnóstico y es recomendable al valorar la remisión en los casos con cariotipo anómalo. Un número creciente de anomalías genéticas de la LMA se identifican mediante RT-PCR o por FISH (Sierra, 2015).

Con base en los resultados de las pruebas anteriores se determina el grupo de riesgo del paciente, favorable, intermedio y adverso. A partir de esto el médico determinará el esquema de tratamiento que debe seguir.

Tabla 2. Clasificación en grupo de riesgo de acuerdo al perfil citogenético y molecular (Tomado y modificado de Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016).

Grupo de riesgo	Perfil citogenético	Perfil citogenético y molecular
Favorable	t(8;21)(q22;q22); inv(16)(p13.1q22) t(15;17)(q22q12)	T(8;21)(q22q22) sin mutación de c-kit Inv(16)(p13;1q22) T(15;17)(q22q12) NPM1 mutado sin FLT3-ITD (CN) Mutación bialélica CEBP α (CN)
Intermedio	CN t(9;11)(p22q23) Anormalidades citogenéticas no clasificables como favorables o adversas	T(8;21)(q22q22) con mutación de c-kit. T(9;11)(p22q239)
Adverso	inv(3)(q21q26.2) t(6;9)(p23;q34) 11q anormalidades diferentes a t(9;11) -5 o del(5q) -7 Cariotipo complejo	Mutación TP53 independientemente del perfil genético CN con mutación de FLT-ITD CN con DNMT3A CN con KMT2A-PTD Inv(3)(q21q26.2) T(6;9)(23q34) Anormalidades 11q diferentes de t(9,11) -5 o del(5q) -7 Cariotipo complejo

h. Tratamiento

El progreso terapéutico en la LMA ha sido modesto, aunque el conocimiento de la biología de la LMA es cada vez más amplio y ha llevado al desarrollo de nuevos fármacos dirigidos, el tratamiento actual aún se basa en gran medida en las piedras angulares clásicas de la quimioterapia de combinación y el uso apropiado del trasplante de células troncales (Löwenberg & Rowe, 2015), con excepción del subtipo de leucemia promielocítica aguda, donde se utilizan agentes hipometilantes como el ácido retinoico (Efficace, 2016). El tratamiento se divide en terapia de inducción y de consolidación postremisión, además de recurrir, en los casos donde sea posible, el trasplante de células hematopoyéticas (TCH) autólogo o alogénico (Leyto, 2018).

Generalmente la terapia de inducción llamada “intensiva”, consiste en la combinación de citarabina con una antraciclina (como la daunorrubicina o la idarrubicina). Este esquema es llamado 7+3 porque se administran durante 3 días ambos fármacos y los 4 restantes sólo la citarabina. Este es el protocolo de la secretaría de salud en México y se utiliza desde hace más de 40 años (*Lancet et al.*, 2018). Sin embargo, no todos los pacientes son candidatos a recibir este esquema ya que la daunorrubicina es altamente tóxica y puede generar daños a los cardiomiocitos (Lubieniecka *et al.*, 2013). Pacientes diagnosticados de grupo de riesgo desfavorable o con más de 60 años tienen que recurrir generalmente a sólo bajas dosis de citarabina y profilaxis para evitar infiltraciones al sistema nervioso (Aguilar *et al.*, 2010) (Tabla 3).

Tabla 3. Esquema de tratamiento para la LMA basado en Aguilar *et al.*, 2010.

Terapia de inducción 7+3							
DÍA	1	2	3	4	5	6	7
Pacientes <60 años/ Candidatos a la terapia intensiva de inducción	Citarabina 100- 200 mg/m ² + Daunorrubicina o Idarrubicina	Citarabina 100- 200 mg/m ² + Daunorrubicina o Idarrubicina	Citarabina 100- 200 mg/m ² + Daunorrubicina o Idarrubicina	Citarabina 100-200 mg/m ²	Citarabina 100-200 mg/m ²	Citarabina 100-200 mg/m ²	Citarabina 100-200 mg/m ² a
Pacientes 60≤ años*/ No son candidatos a la terapia intensiva de inducción/ declinaron a terapia	Bajas dosis de citarabina		Bajas dosis de citarabina		Bajas dosis de citarabina		
	5-azacytidine,decitabine Transfusiones Hidroxiurea (como remplazo del imatinib)						

Así en pacientes jóvenes, es posible conseguir tasas de remisión completa (RC) del 81.9 %, sin embargo, la supervivencia global a los 5 años es de tan solo el 40% y en pacientes de más edad, la tasa de RC es decepcionantemente muy baja (56.5 %) (Tsai *et al.*, 2016). En un estudio retrospectivo, basado en la población, de 5480 pacientes mayores con LMA recién diagnosticada (edad media de 78 años), más de la mitad de los pacientes (53%) que recibieron tratamiento murieron dentro de los 60 días del diagnóstico de LMA (Pollyea *et al.*, 2019).

Una de las técnicas para hacer más eficientes los tratamientos y reducir su toxicidad en las células normales es el encapsulamiento liposomal, que permite liberar los fármacos de forma controlada y llegar al objetivo con facilidad. El CPX-351, fue recientemente aprobado por la US Food and Drug Administration. y es una encapsulación liposomal de los fármacos citarabina y daunorrubicina en una proporción molar de 5:1. Ha demostrado prolongar la sobrevida aún en grupos de riesgo desfavorables. En un estudio reciente en adultos <60 años con LMA, incrementó el porcentaje de la sobrevivencia promedio a los 30 meses, que fue de un 20% (con el esquema convencional 7+3) a un 37% con CPX351(Lancet *et al.*, 2018). Sin embargo el porcentaje aún es bajo y la posibilidad de una sobrevivencia sin recaídas a largo plazo es cuestionable. Otra variante para combatir la LMA es adicionar a la quimioterapia convencional el G-SCF, este factor sensibiliza a las células blásticas de la LMA a los quimioterapéuticos, moviliza a las células leucémicas de la MO hacia el torrente sanguíneo, exponiéndolas a los tratamientos y disminuye la neutropenia (Di Tullio *et al.*, 2017). Se utiliza tanto para terapia de inducción y consolidación (Sperr *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2015).

El conocimiento de la fisiopatología ha permitido entender mejor los diferentes comportamientos de la leucemia e identificar blancos terapéuticos potenciales, agentes citotóxicos, anticuerpos monoclonales e inhibidores de molécula pequeña se añaden a los esquemas establecidos para combatir más específicamente los diferentes subtipos de LMA (Leyto, 2018). Los inhibidores para IDH1, IDH2, FLT3-ITD y BCL-2 son los más usados debido a la frecuencia con la que se presentan estas mutaciones (pollyea *et al.*, 2019; Yogarajah *et al.*, 2018; Larrosa *et al.*, 2017). A pesar de todos estos nuevos tratamientos, las estadísticas de decesos por LMA crecen cada año, y los pronósticos de sobrevida no van más allá de los 5 años (American Cancer Society, 2019; Lancet, 2018). Por esto, es necesario buscar nuevos tratamientos que logren combatir la LMA de manera definitiva aún en grupos con un pronóstico desfavorable.

i. Caseína y leucemia

Aunque las citocinas regulan la hematopoyesis, algunas biomoléculas de origen y naturaleza distinta pueden tener efectos similares sobre las células hematopoyéticas (Ledesma, 2013). Las caseínas, principales proteínas de la leche, es un término colectivo para una familia de fosfoproteínas que acarrean calcio. Se encuentran unidas en una micela conformada por alfa- beta- y kapa- caseínas (Warner, 1976; Hall, 1971). Se ha demostrado que la caseína y sus sub-unidades pueden inhibir el crecimiento de células leucémicas y promover la hematopoyesis de las células normales del linaje mieloide.

j. Caseinato de Sodio (CS)

A partir de la caseína de la leche se han generado productos como el caseinato de sodio (CS). Para realizar esto las micelas de caseína, se mantienen juntas mediante fosfato de calcio coloidal (PCC), este puede eliminarse reduciendo el pH, lo que conduce a la precipitación de la caseína y al lavado. Posteriormente, la caseína se resuspende aumentando el pH con NaOH, lo que da como resultado soluciones acuosas de caseinato de sodio (CS). El CS se usaba desde los años 60s para inducir una respuesta inflamatoria en la cavidad peritoneal de los ratones sanos que eran inoculados con esta solución *vía i.p.*. A partir de ahí se planteó que podía estar promoviendo la diferenciación y movilización de células hematopoyéticas, dos procesos que están disminuidos o ausentes en los pacientes con LMA.

Posteriormente nuestro grupo de trabajo demostró que inhibe la proliferación de diferentes líneas celulares, entre ellas las de la línea leucémica de ratón WEHI-3, J774, P388 y la hematopoyética normal 32D cl3 dependiente de IL-3 (Ramos-Mandujano *et al.*, 2008), por otro lado, acelera la diferenciación de neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares (Santiago *et al.*, 2010) y sinergiza la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal de ratón en presencia de rmlL-3 como factor de crecimiento (Ledesma *et al.*, 2013).

En ensayos *in vivo*, se encontró que el CS aumenta el número de células mononucleares en sangre periférica con el inmunofenotipo de células madre hematopoyéticas (0,2 a 0,5% de células LSK), lo que les permite formar colonias de diversos linajes celulares (Santiago *et al.*, 2015). También, administrado en ratones sanos, induce granulopoyesis (Figura 4) (Domínguez *et al.*, 2012) y prolonga la supervivencia hasta en un 40 % y atenúa las manifestaciones de la enfermedad en ratones inoculados letalmente con células leucémicas WEHI-3 o J774 (Córdova-Galaviz *et al.*, 2014; Ledesma *et al.*, 2012), sin embargo al cultivar la MO de estos ratones sobrevivientes después del tratamiento aún prevalecen las células blásticas auto proliferantes, evidencia que la leucemia prevalece a pesar del tratamiento y la supervivencia. En este trabajo se analiza si la combinación de CS con citarabina o daunorrubicina ayuda en la erradicación de la leucemia en modelos de ratón.

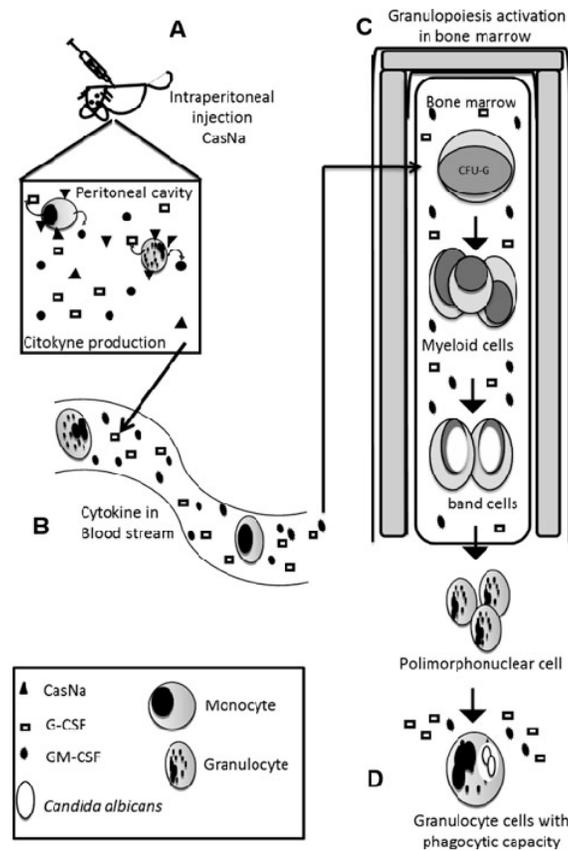


Figura 4. Mecanismo de acción sugerido del CS inoculado vía *i.p.* en un ratón sano BALB/c. (Tomado de Domínguez-Meléndez *et al.*, 2012).

6. Planteamiento del problema

La terapia intensiva con citarabina y daunorrubicina puede llevar a la remisión completa, sin embargo, debido a su alta toxicidad no todas las personas son candidatas a recibir este tratamiento. El CS elimina a las células leucémicas y regula la hematopoyesis, pero no erradica la enfermedad en ratones leucémicos. Se desconoce si la coadministración de CS con citarabina o daunorrubicina puede presentar un efecto sinérgico que aumente la toxicidad contra las células leucémicas para erradicarlas y sin afectar las células normales, potenciando el efecto de ambos tratamientos para poder combatir la LMA.

7. Justificación

Debido a que el esquema actual para el tratamiento de la LMA tiene un bajo porcentaje de éxito libre de enfermedad y que disminuye con la edad, este trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto del CS en combinación con los fármacos citarabina o daunorrubicina, sobre la LMA. Se busca un efecto sinérgico entre los dos tratamientos que potencie el efecto para erradicar a las células leucémicas sin afectar células hematopoyéticas sanas, así reducir los efectos secundarios, particularmente para aquellos pacientes con fragilidad, y con ello generar una posible terapia curativa para los pacientes que garantice la supervivencia a largo plazo sin importar su grupo de riesgo.

8. Hipótesis

La citarabina y la daunorrubicina son citotóxicas para las células leucémicas, pero también para las normales; por otro lado el CS inhibe la proliferación de células leucémicas mieloides, promueve la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas normales y prolonga la supervivencia de ratones leucémicos, así al combinar el CS con la citarabina o la daunorrubicina, potenciará la inhibición de la proliferación de la línea celular leucémica WEHI-3. En los ensayos *in vivo* prolongará la supervivencia de los ratones debido a la capacidad de inducir diferenciación en las células hematopoyéticas normales e inhibir a las leucémicas, adicionalmente el CS combinado con los antineoplásicos ya mencionados se potenciará el efecto de la terapia sin comprometer el sistema inmunológico de los ratones prolongando la supervivencia pero con eliminación completa de células auto proliferantes.

9. Objetivos

General

Evaluar el efecto sinérgico del caseinato de sodio en combinación con citarabina o daunorrubicina en la eliminación de células leucémicas WEHI-3.

Particulares

In vitro

- Evaluar el efecto del CS, la citarabina, la daunorrubicina, CS- citarabina o CS-daunorrubicina sobre la proliferación, viabilidad e inducción a apoptosis de células leucémicas WEHI-3.
- Evaluar el efecto del CS la citarabina, la daunorrubicina y sus combinados sobre la proliferación en el cultivo de células de médula ósea de ratón BALB/c.

In vivo

- Establecer el modelo de leucemia en ratones BALB/c empleando células WEHI-3.
- Analizar la supervivencia de ratones BALB/c leucémicos tratados con diferentes dosis de Daunorrubicina, Citarabina, CS y sus combinados.
- Analizar el efecto de las dosis combinadas de Daunorrubicina, Citarabina y CS sobre la proliferación *in vitro* y morfología de las células de médula ósea obtenidas 30 y 60 días después de la inducción de la leucemia con y sin la presencia de rmlL-3.

10. Materiales y método

a. Cultivo líneas celulares

a.1. Cultivo de la línea celular leucémica WEHI-3

La línea WEHI-3 se obtuvo por medio de ATCC (American Type Culture Collection) y se mantendrá en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) desactivado (Gibco BRL, USA) y 1.5 uL/mL de β -mercaptoetanol (Sigma- Aldrich, St Louis, Mo), a una densidad de 2×10^4 células/mL, con una temperatura constante de 37°C y 5% de CO₂. Se expandieron cada 48 h.

a.2. Cultivo de células mononucleadas de médula ósea (CMN-MO)

Usando ratones clínicamente sanos de la cepa CD1, que fueron sacrificados por dislocación cervical. Los fémures se obtuvieron en condiciones estériles y se arrastraron las células totales de médula ósea, haciendo fluir IMDM (Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de SFB (Gibco, USA). Posteriormente se separaron las CMN-MO mediante un gradiente de densidad (ficol densidad=1.077 g mL⁻¹) (Sigma, St Louis, M), y por último se realizó el cultivo de las células en IMDM suplementado con 15% de SFB (Gibco BRL, USA), 5% de suero equino e interleucina-3 recombinante de ratón (mrIL-3) en placas de 96 pozos (Corning NY, USA).

b. Evaluación de la proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta.

Para la evaluación de la actividad antiproliferativa de los extractos se empleó la línea celular WEHI-3 (leucemia mielomonocítica de ratón) y células mononucleadas de médula ósea de ratón normal, cultivándolas a una densidad de 5×10^3 y 1×10^5 células mL⁻¹ en medio de cultivo respectivamente, bajo las condiciones antes descritas. En el tiempo cero las células se estimularon con diferentes concentraciones de CS (0.25, 0.5, 1, 2, y 4 mg/mL), daunorrubicina (0, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 ng/mL) o citarabina (0, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 µg/mL), y como vehículo se estimularán con PBS.

El cultivo se mantuvo por 72 horas para la línea celular WEHI-3 y 120 horas para las células mononucleadas de médula ósea de ratón normal. Después del tiempo de incubación, la proliferación celular fue evaluada mediante la técnica de cristal violeta modificada por Kueng (1989) y originalmente propuesta por Gillies *et al.*, 1986. Las células se fijaron con glutaraldehído al 1% durante una hora, después se adicionó la solución de cristal violeta al 1.1%, agitando por diez minutos y se retiró el exceso de colorante con agua destilada; inmediatamente se agregaron 50 µL pozo -1-1 de ácido acético al 10% agitando durante 20min, para solubilizar el colorante. La densidad óptica de las células se evaluó a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (SpectraTecan Image, Austria), y los datos obtenidos fueron graficados en porcentaje de proliferación.

c. Manejo de animales

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-199. Se usaron ratones machos BALB/c de 4 a 5 meses de edad en condiciones libres de patógenos y alimentados con una dieta estándar de laboratorio, mantenidos 12 horas luz y 12 horas oscuridad bajo temperatura controlada en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM .

d. Modelo de leucemia en ratones BALB/c inducido con células WEHI-3.

Para establecer el modelo, se cultivaron las células por no más de 10 pasajes hasta llegar a la densidad de 25×10^6 , confirmando la viabilidad de más del 90%, se lavaron dos veces con PBS y se llevaron a una concentración de células de 1×10^6 /mL de PBS. En cada ensayo (dosis independientes o combinadas) los ratones recibieron 250,000 células en 250 μ L de PBS como vehículo. Cada ensayo se realizó por duplicado.

e. Tratamiento

Caseinato de Sodio (CS). El CS (Spectrum USA) se solubilizó en PBS (Solución Buffer de fosfatos) y se esterilizó por autoclave. Los ratones fueron administrados vía *i.p.* cada 48 h.

f. Evaluación de supervivencia

f.1. Dosis independientes

Se construyeron 12 grupos experimentales con una n=5 como sigue:

Control sano, Control +WEHI-3, Vehículo (PBS) +WEHI-3, Cita+WEHI-3 (1mg/kg), Cita+WEHI-3 (3mg/kg), Cita+WEHI-3 (6mg/kg), Dauno+WEHI-3(0.5mg/kg), Dauno+WEHI-3(1mg/kg), Dauno+WEHI-3(3mg/kg), CS+WEHI-3(2mg/kg), CS+WEHI3 (4mg/kg) y CS+WEHI-3 (8 mg/kg).

Las dosis intermedias usadas para citarabina y daunorrubicina son las utilizadas clínicamente, mientras que la dosis intermedia del caseinato de sodio fue la reportada por Ledesma, 2013.

Se registraron los decesos cada 24h y se graficaron por un análisis de Kaplan-Meier.

f.2. Dosis combinadas

Se tomaron las dosis más efectivas del ensayo anterior, y se construyeron nueve grupos experimentales con una n=5 cada uno como sigue:

Control sano, Control +WEHI-3, Vehículo (PBS)+WEHI-3, Cita+WEHI-3, Dauno+WEHI-3, CS, CS-Cita, CS-Dauno y Cita-Dauno.

Se registraron los decesos cada 24h y se graficaron por un análisis de Kaplan-Meier. En el día número 30 y 60 de tratamiento, un individuo de cada condición fue sacrificado para extraer fémur y recuperación de células de médula ósea.

g. Identificación de células WEHI-3 *in vivo*

Se recuperaron las células mononucleadas de médula ósea de ambos fémures de los ratones tratados en el día 30 y 60, llevándolas a cultivo *in vitro* en placas de 96 pozos, en ausencia y presencia de rmlL-3 como factor de crecimiento exógeno y la proliferación se evaluó a las 120 h por el procedimiento de cristal violeta indicado anteriormente.

h. Formación de colonias

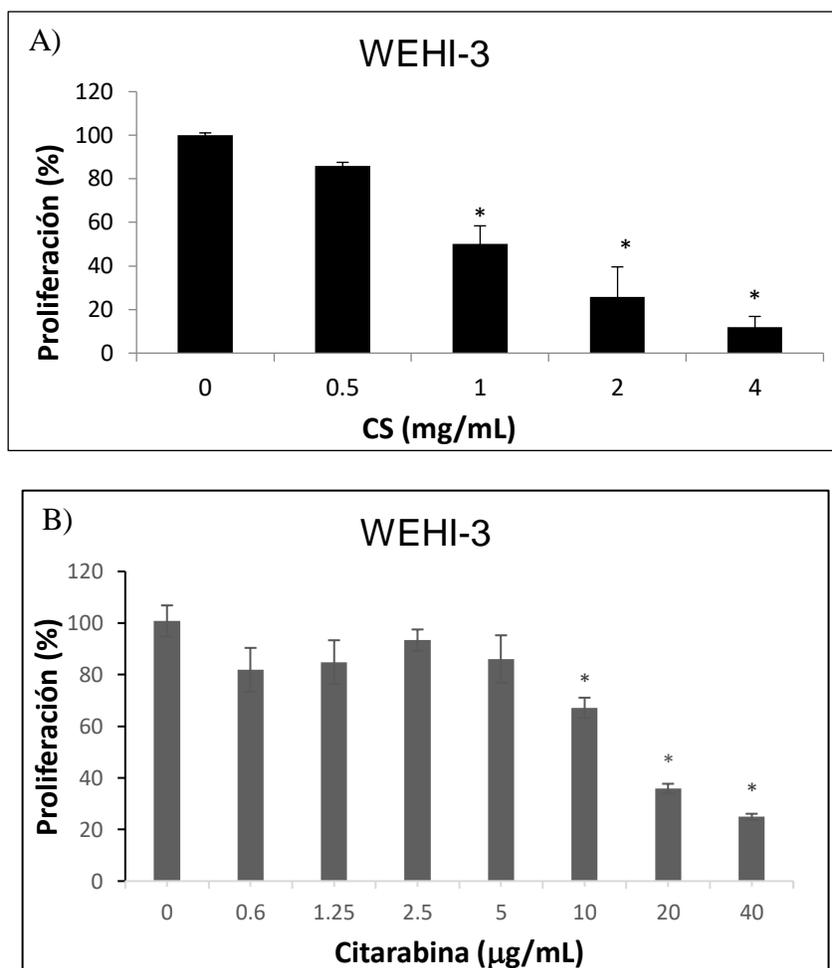
Se recuperaron las CMN de MO de ambos fémures de los ratones tratados hasta el día 70, se cultivaron en placas de 12 pozos por 120 h en presencia y ausencia de rmlL-3 como factor de crecimiento, después se retiró el medio de cultivo y se dejó secar por 5 minutos. Se realizó una tinción con hemocolorante rápido (HYCEL, México) dónde se colocó en el siguiente orden: una solución fijadora, el hemocolorante 1 (reactivo de color rojo) y el hemocolorante 2 (reactivo de coloración azul) con un intervalo de 5 segundos entre cada uno. Posteriormente se realizaron lavados para eliminar el exceso de colorante y se observó la placa en un microscopio invertido a 10x, 20x y 40x.

i. Análisis de datos

Todos los bioensayos fueron realizados tres veces de manera independiente por cuadruplicado. Los datos fueron presentados como media desviación estándar. Para determinar la diferencia significativa se aplicará un análisis de varianza (ANOVA), con la prueba de Tukey ($p. \leq 0.05$) para obtener la diferencia significativa empleando el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., USA).

11. Resultados

Para analizar el posible efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación de WEHI-3 en presencia de CS, citarabina o daunorrubicina, fue necesario realizar un ensayo de inhibición de la proliferación dependiente de la concentración. Los resultados indican que cada uno de los compuestos inhibe la proliferación en forma dependiente de la concentración con diferencia significativa a partir de 1 mg/mL para CS, 10 $\mu\text{g/mL}$ para citarabina y 5 ng/mL para daunorrubicina (Figura 5).



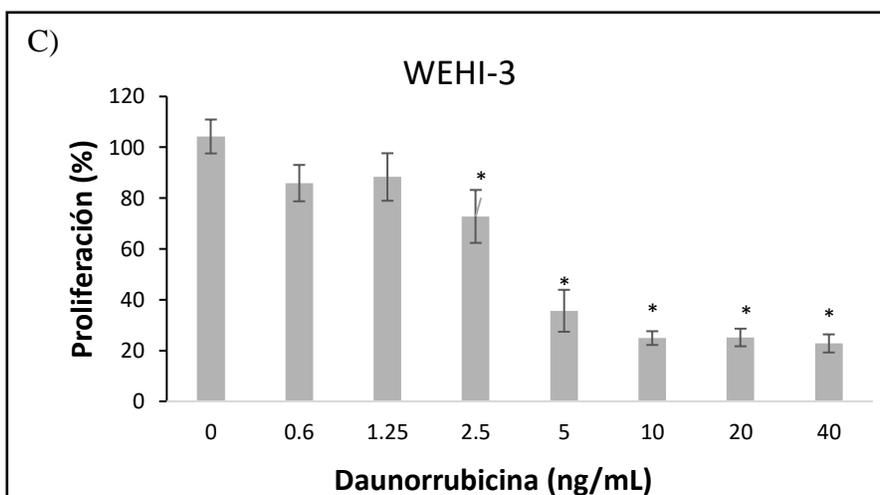


Figura 5. Curvas de proliferación de células WEHI-3 tratadas con diferentes dosis de CS (A), citarabina (B) y daunorubicina (C), después de 72 h de cultivo y evaluadas con la técnica de cristal violeta. Promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada una \pm Desviación estándar. * Los resultados significativamente diferentes con respecto al control (0) con la prueba de Tukey ($p. \leq 0.05$).

Usando los datos de la Figura 5, se calculó la IC_{50} para cada tratamiento indicadas en la siguiente tabla:

Tabla 4. Dosis media de inhibición del caseinato de sodio, citarabina y daunorubicina en células WEHI-3.

Tratamiento	IC_{50}
CS	1.85 mg/mL
Citarabina	17.8 μ g/mL
Daunorubicina	5.7 ng/mL

La combinación del CS con daunorrubicina o citarabina muestra un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación de las células WEHI-3.

Con la finalidad de validar experimentalmente la IC_{50} , se cultivaron las células WEHI-3 en presencia de 1.85 mg/mL, 17.8 μ g/mL y 5.7 ng/mL de CS, citarabina y daunorrubicina, respectivamente. Los resultados coinciden con la reducción de la proliferación al 50 % de control sin tratamiento. Por otro lado, con la finalidad de tener valores de inhibición de la proliferación menores a la IC_{50} , se empleó la IC_{25} de cada compuesto usando 0.925 mg/mL, 8.9 μ g/mL y 2.85 ng/mL de CS, citarabina y daunorrubicina, respectivamente. Los resultados indican que efectivamente, en todos los casos se tiene un valor de proliferación de alrededor del 75 % (Figura 6). Sorpresivamente, la combinación de las IC_{25} sólo alcanzó el 30% en la combinación de CS-cita y por debajo del 25% en las combinaciones CS-dauno y dauno-cita con respecto al control (Figura 6), con diferencias significativas en los valores por debajo de lo reportado para la IC_{50} individual, incluso por debajo de la sumatoria de la inhibición inducida por cada uno de los compuestos en la concentración de IC_{25} (Figura 6), lo que pone en evidencia el efecto sinérgico de la combinación para reducir la proliferación (Tabla 5).

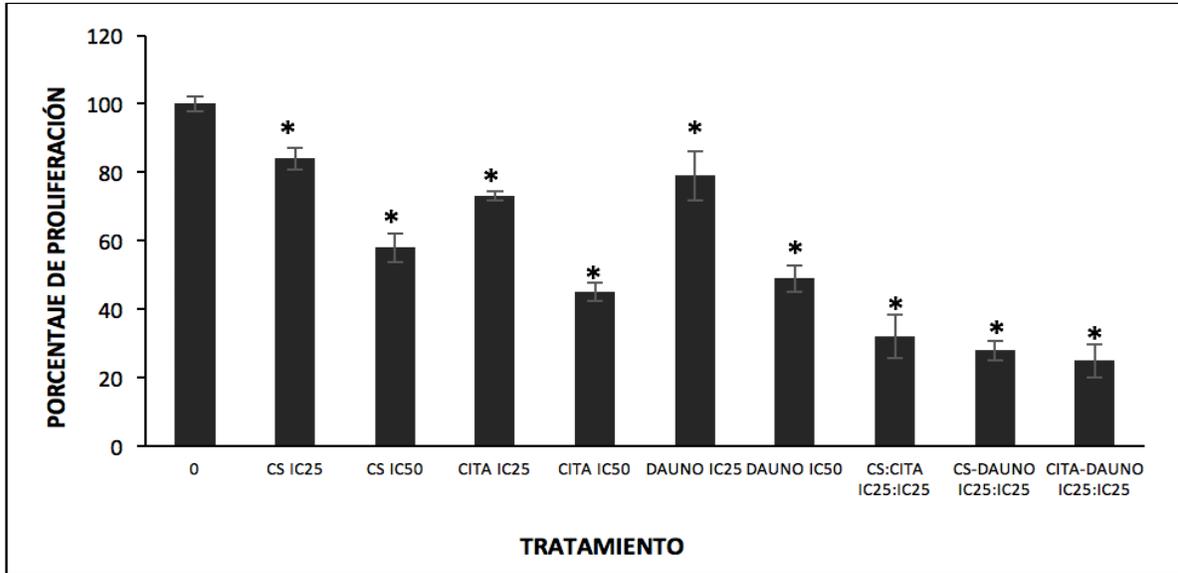


Figura 6. Proliferación de células WEHI-3 estimuladas con IC₂₅ e IC₅₀ de citarabina, daunorrubicina y CS, solos o en combinación. Promedio de tres experimentos independientes. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto al control (0 mg/mL) en la prueba de Tukey.

Tabla 5. Comparativa de los datos esperados versus los obtenidos experimentalmente al combinar los fármacos de citarabina y daunorrubicina que revelan efecto sinérgico.

Sumatoria esperada de los porcentajes de inhibición (IC ₂₅) evaluados individualmente	Porcentaje de inhibición de los tratamientos combinando las IC ₂₅ evaluado experimentalmente.
CS-cita 40%	CS-cita 65%
CS-dauno 37%	CS-dauno 70%
Cita-dauno 47%	Cita-dauno 75%

El CS promueve la proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratón BALB/c

Con la finalidad de comparar el efecto del CS, la citarabina y la daunorrubicina sobre la proliferación de las células leucémicas y normales, se realizó un cultivo de CMN de MO de ratón BALB/c y se estimuló con las mismas dosis (IC_{25} e IC_{50}) del ensayo anterior de los compuestos individuales y en combinación.

Como controles se cultivaron las células en presencia y ausencia de rmlL-3, ya que las CMN de MO no necesitan esta interleucina para proliferar. Las células que fueron cultivadas solo en presencia de rmlL-3 se les adicionaron 20 μ l de PBS (control +PBS).

Las células en ausencia de rmlL-3 no proliferaron, pero en su presencia si y fue casi del doble con o sin adición de control +PBS, mientras que las estimuladas con IL-3 más la IC_{25} e IC_{50} de CS aumentaron su proliferación en más del 60% en comparación con el Control + PBS (Figura 5). La adición de citarabina IC_{25} no muestra una disminución significativa en la proliferación a diferencia de su IC_{50} que la disminuye en más del 30% respecto al Control + PBS, por su parte la daunorrubicina tampoco muestra diferencias significativas en la dosis de IC_{25} pero en la dosis de IC_{50} la proliferación es nula respecto al Control + PBS. La adición de las dosis combinadas de IC_{25} cita-dauno, disminuye la proliferación hasta los niveles del cultivo sin rmlL-3, sin embargo, las combinaciones con CS (CS-cita y CS-dauno) la proliferación alcanza los niveles del Control + PBS y por encima de la obtenida en las concentraciones individuales de citarabina y daunorrubicina (Figura 7).

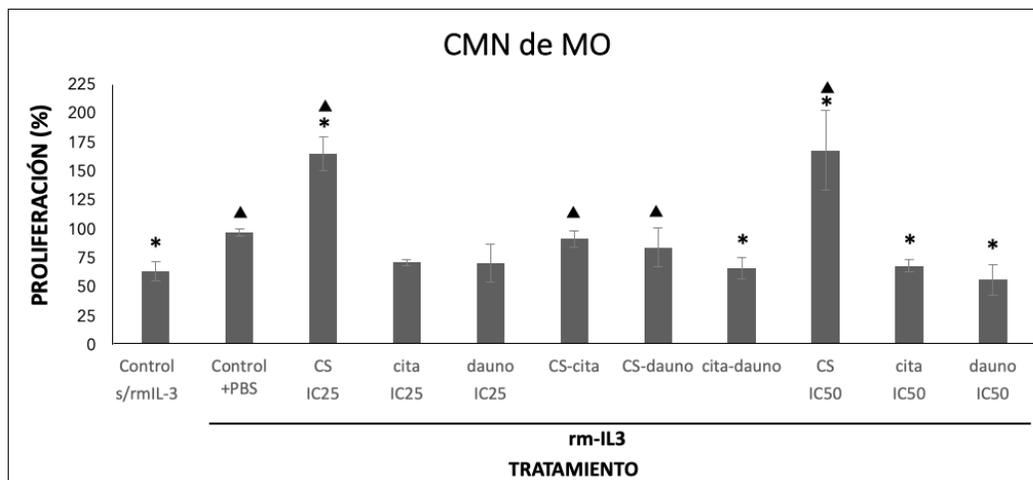


Figura 7. Proliferación de células mononucleadas de médula ósea (CMN de MO) de ratón BALB/c estimuladas con IC25 e IC50 de citarabina, daunorrubicina y CS, solos o en combinación. Promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada una con significancia estadística * respecto al control sin rmIL-3, ▲ respecto al control+PBS con la prueba de Tukey t p <0,05.

In vivo

Los ratones leucémicos tratados con diferentes dosis de CS, citarabina y daunorrubicina sobreviven hasta 15 días más que los que no reciben tratamiento.

Para inducir migración de granulocitos a la cavidad peritoneal de ratón se emplea 0.1g/mL en PBS de CS (10% p/v) por ratón y es equivalente a 2g de CS/kg de peso de ratón, bajo este esquema se tomó esta dosis ya reportada en la literatura y se plantearon dos dosis más, una al 5% p/v y otra al 20% p/v. Ratones leucémicos inducidos con la línea celular WEHI-3 fueron tratados cada 48 h vía *i.p.* con CS en la dosis de 1, 2 y 4 g/Kg de peso de ratón (Figura 8). Para establecer las dosis de citarabina y daunorrubicina se tomó como referencia las dosis clínicas utilizadas actualmente para el tratamiento de la LMA, 3 mg/kg de citarabina y 0.5 mg/kg de daunorrubicina a partir de estos datos se plantearon dos dosis más para cada

tratamiento una por debajo de la dosis clínica y otra por arriba de esta (Figura 9 y 10).

Todos los ratones de los grupos control WEHI3+ sin tratamiento y vehículo murieron entre el día 20 y el día 27 después de la inducción de la leucemia (Figuras 8,9 y 10).

En los grupos administrados con 4 mg/kg de CS los decesos fueron iguales a control (WEHI3+), la dosis más baja de 1mg/kg de peso prolongó la sobrevivida hasta el día 30 en un 20% de los ratones, mientras que en la dosis de 2 mg/kg al día 30 más del 60% seguía con vida, y la sobrevivida se prolongó hasta el día 38 en el 20% de la población (Figura 8).

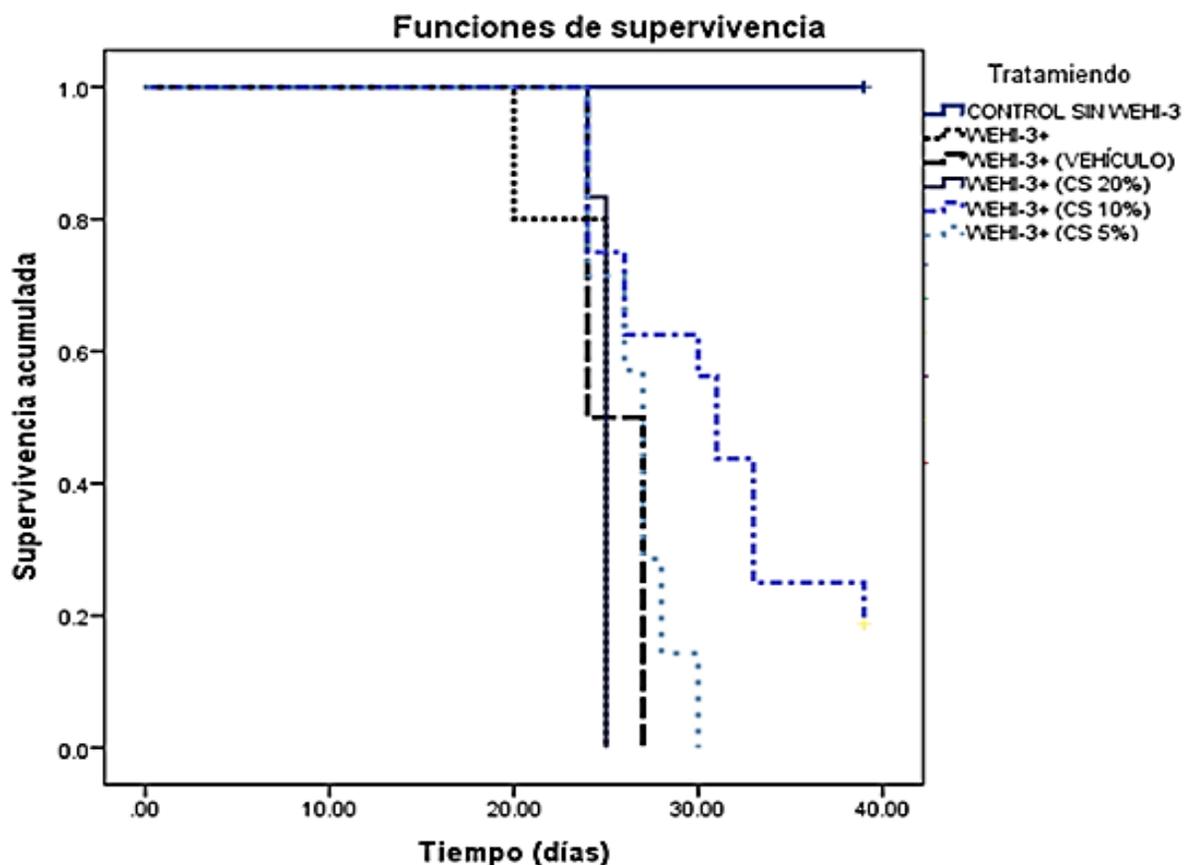


Figura 8. Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con diferentes dosis de caseinato de sodio (CS). Análisis de Kaplan Meier.

Para los tratamientos de citarabina el grupo administrado con la dosis más alta de 6mg/kg no mostró una diferencia con respecto a los grupos control WEHI3+, 1 mg/kg de peso prolongó la sobrevida como máximo hasta el día 30, el de 3mg/kg contaba con el 23% de sobrevida de la población al día 30 y con el 10% hasta el día 38 (Figura 9).

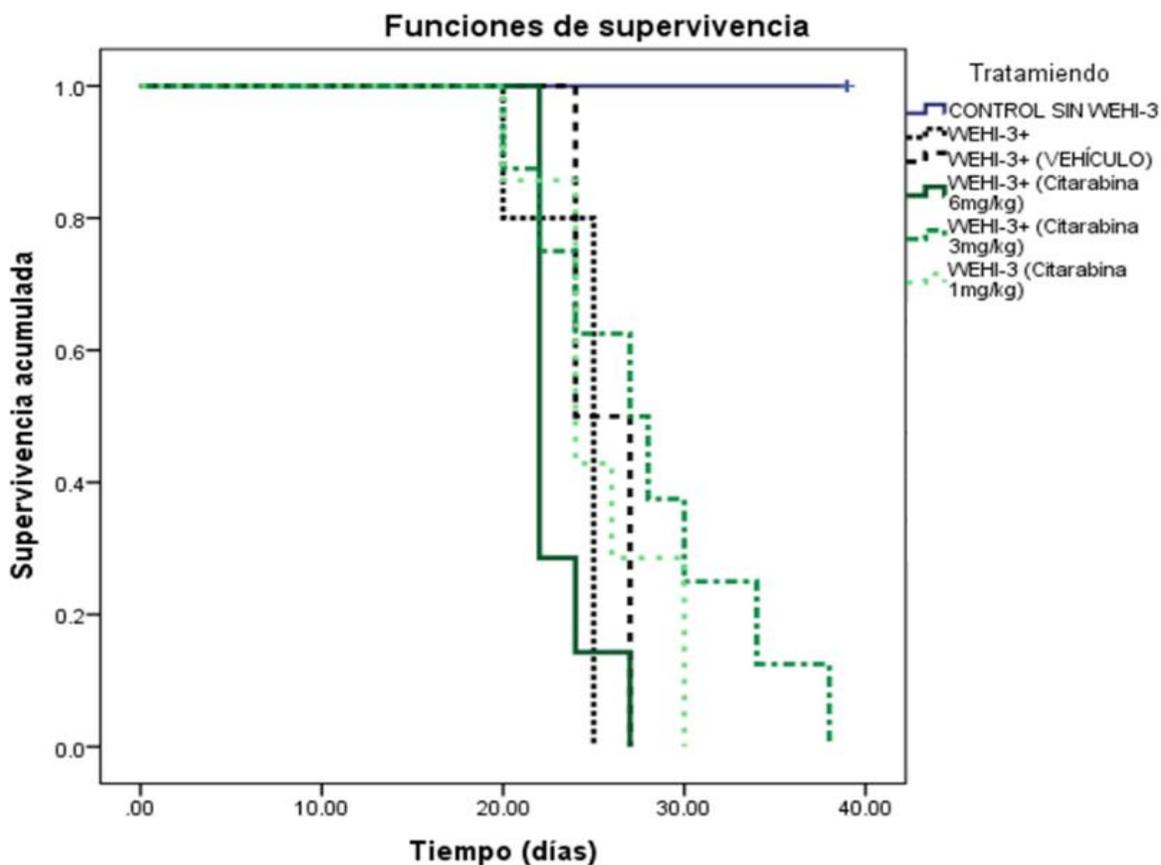


Figura 9. Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con diferentes dosis de citarabina. Análisis de Kaplan Meier.

En los grupos tratados con daunorrubicina la dosis de 3 mg/kg disminuyó el tiempo de vida a 15 días después de la inducción, 10 días por debajo de los controles WEHI-3+, la de 1 mg/kg sólo prolongó la sobrevivida del 18% de los ratones hasta el día 40 y la más baja (0.5 mg/kg) fue la más exitosa manteniendo la sobrevivida de más del 80% de los ratones en el día 30 y del 40% hasta el día 40 (Figura 10).

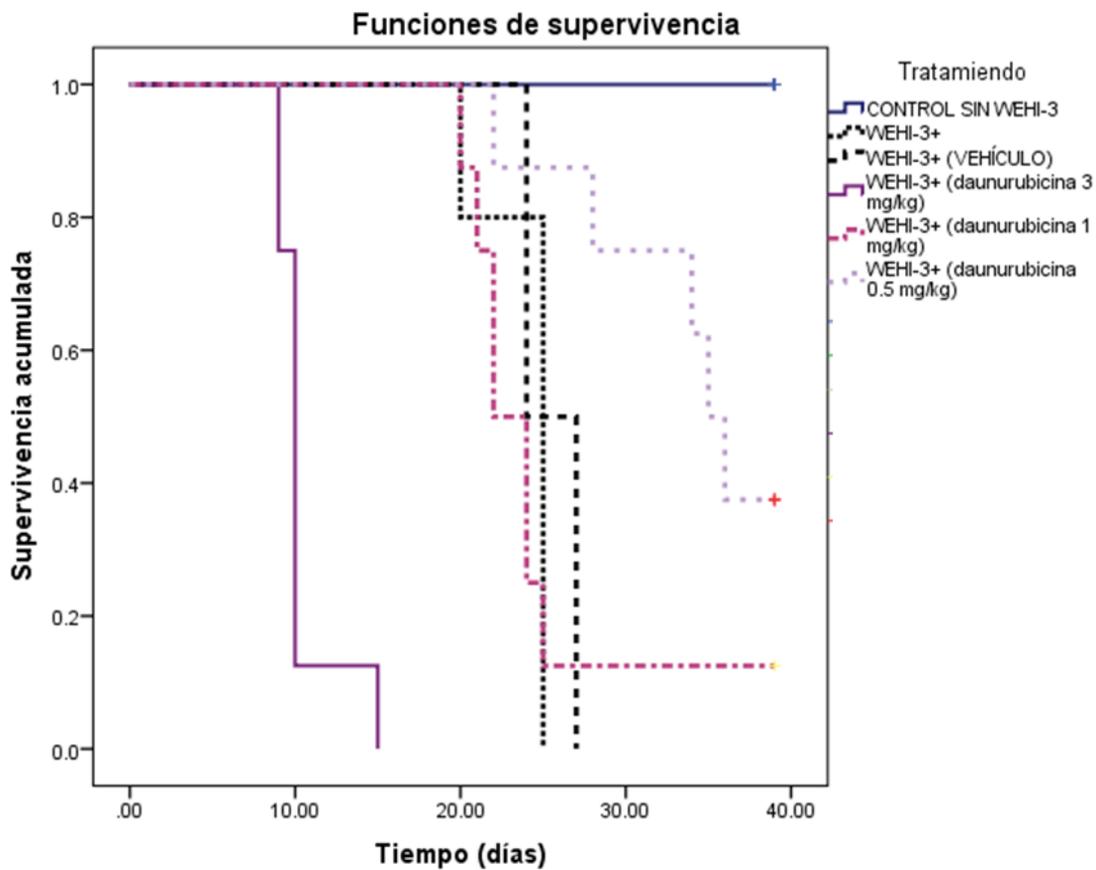


Figura 10. Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con diferentes dosis de daunorrubicina. Análisis de Kaplan Meier.

Los ratones leucémicos tratados con dosis combinadas de CS-citarabina o CS-daunorrubicina sobreviven más de 70 días.

Ratones leucémicos fueron tratados vía *i.p.* cada 48 h con las dosis individuales más exitosas del ensayo anterior (2g/kg CS, 3 mg/kg cita, 0.5 mg/kg dauno) o éstas, pero combinadas (CS-cita, CS-dauno, cita-dauno) por lo cual se manejaron seis grupos, más un grupo de control sano, un control WEHI3+ sin tratamiento y un control WEHI-3+ tratado con solo vehículo.

Se encontró que citarabina, vehículo o control WEHI-3+, tienen una curva de supervivencia similar pero no más de 38 días, la de CS o daunorrubicina es de 44 y 48 días respectivamente, mientras que las combinaciones alcanzaron supervivencia más prolongadas; cita-dauno tiene una sobrevida del 41% a los 40 días y de cero a los 50 días, CS-cita induce una sobrevida del 40 % a los 40 y se mantiene el 10% por más de 70 días, finalmente CS-dauno mostró una supervivencia del 85% a los 50 y el 20 % a los 70 días (Figura 11 y tabla 6).

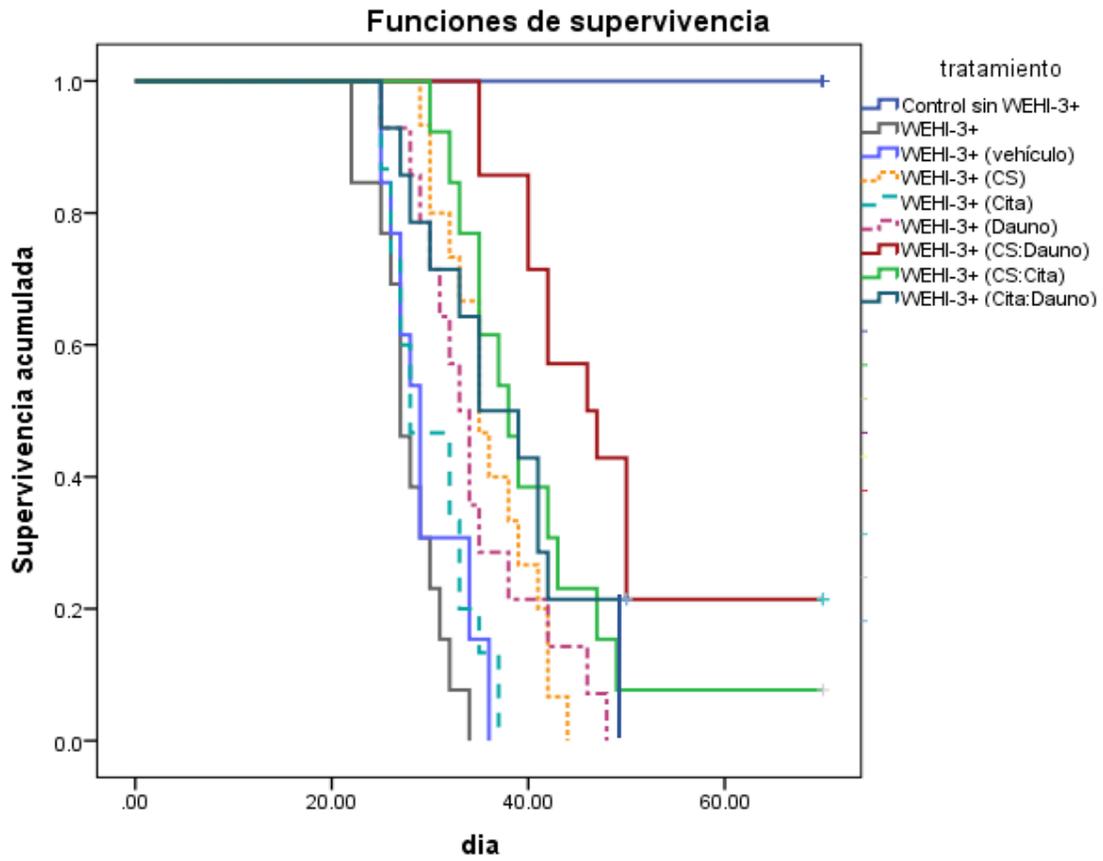


Figura 11. Supervivencia de ratones leucémicos inducidos con WEHI-3 tratados con daunorrubicina, citarabina, CS o combinados. Análisis de Kaplan Meier

Tabla 6. Porcentaje de supervivencia a los 40 y 60 días de tratamiento después de la inducción de la LMA.

	40 días	60 días
Tratamiento	Porcentaje de supervivencia	
Sano	100	100
WEHI-3	0	0
WEHI-3 vehículo	0	0
WEHI-3 CS	25	0
WEHI-3 Cita	0	0
WEHI-3 Dauno	20	0
WEHI-3 CS-cita	40	0
WEHI-3 CS-dauno	85	10
WEHI-3 cita-dauno	41	20

En el cultivo de MO de los ratones leucémicos tratados durante 30 días las células proliferan aún sin IL-3 excepto con el tratamiento citarabina-daunorrubicina.

Al día 30 después de la inducción de la leucemia se sacrificó un ratón de cada tratamiento para evaluar si sus células de médula ósea presentaban células proliferantes en ausencia de IL-3 (auto proliferantes), citocina indispensable para el crecimiento de células mononucleadas de médula ósea de ratones sanos, y que además es expresada de manera constitutiva por las células WEHI-3, que, de presentarse la proliferación, indica presencia de células leucémicas.

Después de 120 h de cultivo tanto en los grupos de tratamientos individuales como en las dosis combinadas las células proliferan en ausencia de IL-3 lo que revela la presencia de células autoproliferantes y por tanto leucémicas, excepto en el tratamiento de cita-dauno donde no proliferaron aún con la adición de rmlL-3 lo que es indicador del daño a la MO (Figura 12).

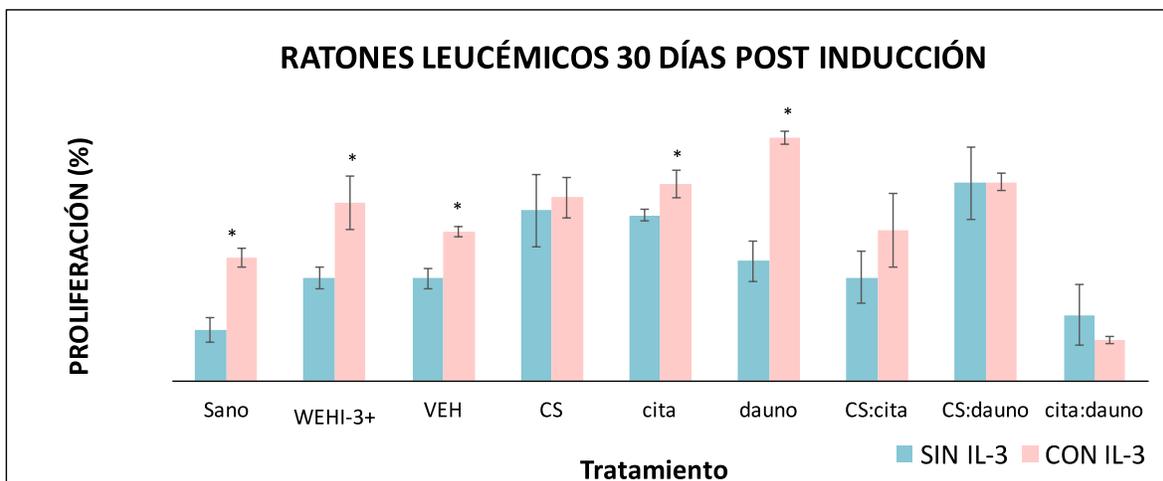


Figura 12. Proliferación células mononucleadas ratones leucémicos a los 30 días post inducción y tratamientos, en ausencia o presencia de rmlL-3. Cultivados durante 120 h y evaluados por la técnica de cristal violeta. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto al control sano con rmlL-3 en la prueba de Tukey.

Los ratones sobrevivientes a los 60 días de tratamiento después de la inducción no presentan células autoproliferantes.

Al día 60 después de la inducción de la leucemia se sacrificó un ratón de cada uno de los grupos que contaban con ratones sobrevivientes para evaluar si sus células de médula ósea presentaban células autoproliferantes.

Los dos únicos tratamientos que sobrevivían al día 60 fueron CS-cita y CS-dauno, en ninguno de los dos se observó células autoproliferantes, pero la adición de rmlL-3, a la médula ósea de ratones tratados con CS-dauno promovió la proliferación, sin embargo, en el tratamiento de CS-citarabina las células no proliferan aún con rmlL-3, señal de daño a la MO (Figura 13)

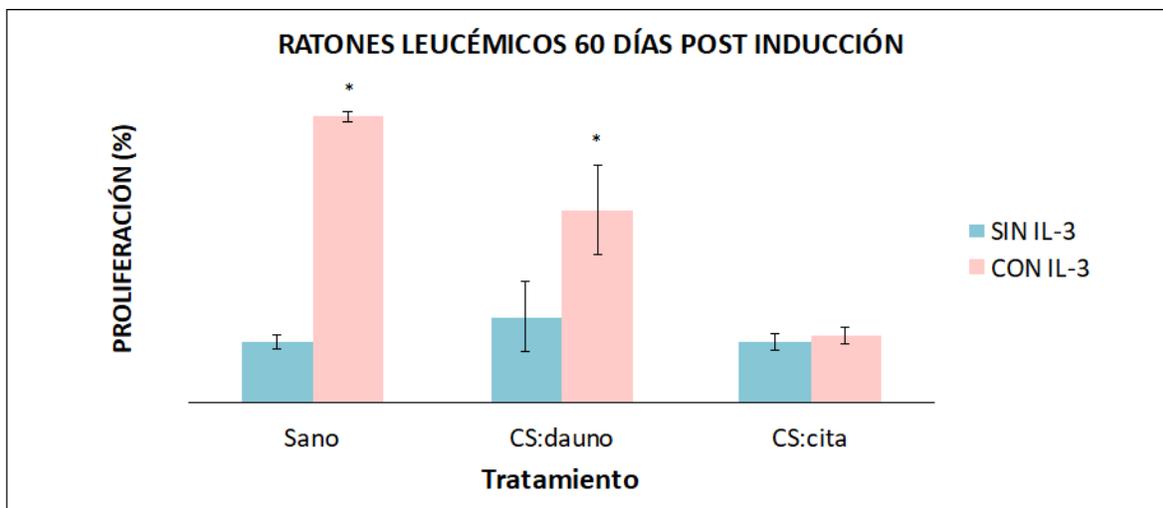


Figura 13. Proliferación células mononucleadas ratones leucémicos sobrevivientes a los 60 días post inducción y tratamientos, en ausencia o presencia de rmlL-3. Cultivados durante 120 h y evaluados por la técnica de cristal violeta. Significancia estadística * $p < 0.05$ respecto al control sano con rmlL-3 en la prueba de Tukey.

Los ratones tratados con la combinación de cita-dauno presentan fragilidad ósea.

Para obtener las células de MO es necesario obtener el fémur en condiciones de esterilidad y limpiarlo de cualquier tejido extramedular, para ello se utilizan herramientas como pinzas de disección que pueden ejercer presión sin dañar el tejido óseo. El fémur se extrae completo en el grupo de ratones sanos, en leucémico sin tratamiento o tratado con CS (fragilidad 0), pero los tratados con citarabina o daunorrubicina, el fémur es más delgado y frágil (fragilidad 1), pero en cita-dauno fue casi imposible obtener el fémur intacto (fragilidad 2) después de 30 días de tratamiento. Por otro lado, la combinación CS-cita, el vigor óseo se mantiene como en el control a pesar que la citarabina sola induce fragilidad 1 (Tabla 7). En la tabla se califica cualitativamente esta característica.

Tabla 7. Análisis cualitativo de la fragilidad ósea de los ratones a los 30 días de tratamiento después de la inducción. 0=sin fragilidad ósea 1=fragilidad ósea moderada 2=fragilidad ósea alta, impide que se obtenga correctamente el total de la MO.

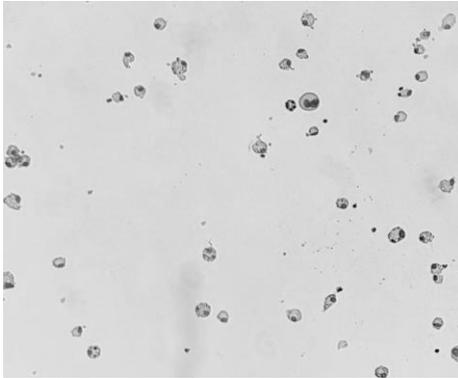
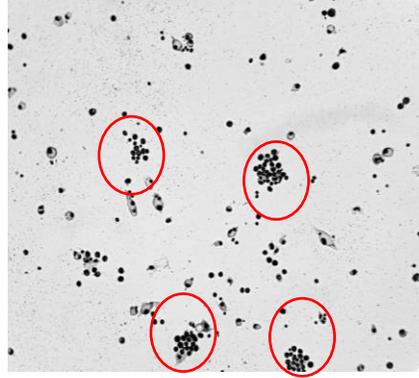
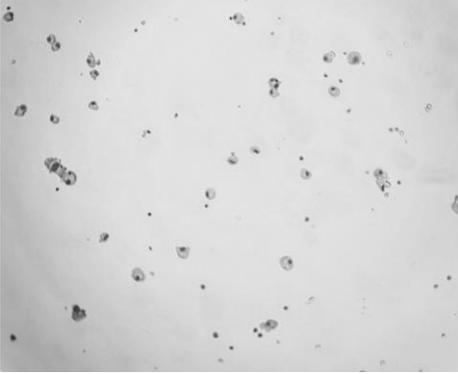
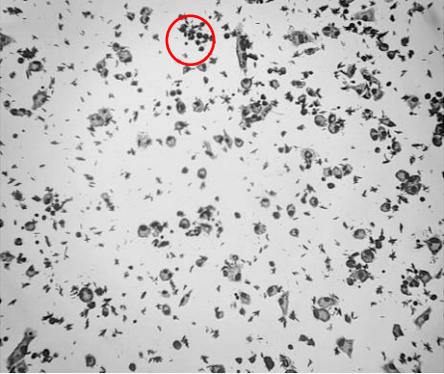
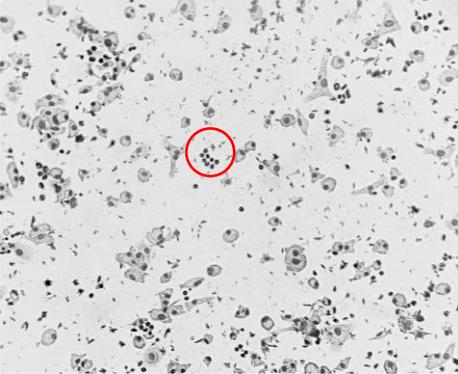
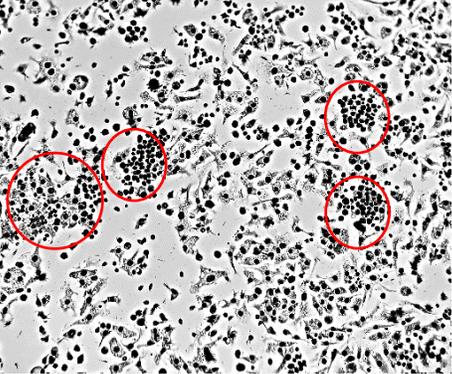
Tratamiento	Nivel de fragilidad ósea (30 días)		
	0	1	2
Ratón Sano	x		
Ratón WEHI-3+	x		
CS	x		
Citarabina		x	
Daunorrubicina		x	
CS-cita	x		
CS-dauno		x	
Cita-dauno			x

Después de los 60 días de tratamiento se realizó un cultivo de MO de un ratón de CS-cita y uno CS-dauno, además de un ratón sano, para evaluar la diferenciación y formación de colonias con y en ausencia de rmlL-3.

En el cuadro se puede observar que, en el cultivo de las células del ratón sano, las células sin rmlL-3 no existe proliferación, mientras que las cultivadas en presencia de rmlL-3 incluso formaron colonias. En aquellas provenientes del tratamiento combinado de CS-cita no existe proliferación celular en ausencia de rmlL-3 y al ser estimuladas con esta las células proliferan más que el control sano, pero no hay presencia de formación de colonias.

Para las células del ratón tratado con CS-daunorrubicina existe proliferación aun sin rmlL-3, sin embargo hay formación de colonias diferenciadas, mientras las estimuladas con rmlL-3 tienen alto nivel de proliferación, diferenciación y capacidad de formar colonias comparado con el cultivo del ratón sano (Tabla 8).

Tabla 8. Cultivo de 120 h MO en ausencia y presencia de rmlL-3 para observar diferenciación y formación de colonias de granulocitos.

TRATAMIENTO	Sin rmlL-3	Con rmlL-3
Sano		
CS-cita		
CS-dauno		

12. Discusión

La LMA es uno de los tipos de leucemia más frecuentes en adultos según la American Society of Clinical Oncology, para combatirla generalmente se usa la combinación de la citarabina con una antraciclina (7+3), este esquema de fármacos se ha utilizado por más de dos décadas (Dombret & Gardin, 2016). Más recientemente una encapsulación liposomal de los mismos fármacos: citarabina y daunorrubicina en una proporción molar 5:1, llamada CPX-351, ha sido aprobada para ser administrada (Lancet *et al.*, 2018). A pesar de esto, no se han logrado obtener un aumento radical en el porcentaje de sobrevida de los pacientes. Intentos por mejorar este esquema con la adición de otros fármacos o la intensificación de la terapia posterior a la remisión no lograron mejorar los resultados.

En este estudio demostramos que el CS combinado con la citarabina o la daunorrubicina presenta un efecto sinérgico antiproliferativo sobre las células de leucemia mielomonocítica WEHI-3 comparado con los fármacos individuales.

Para comprobar el efecto individual de cada tratamiento sobre las células de LMA de ratón WEHI-3 realizamos curvas de proliferación y obtuvimos las IC_{50} e IC_{25} del CS, la citarabina y la daunorrubicina. La IC_{50} de la daunorrubicina fue de 5.7 ng/mL, mientras que la de citarabina fue de 17.8 μ g/mL. En otros estudios sobre tratamientos para la leucemia y resistencia a fármacos, la daunorrubicina o las antraciclina en general, siempre tienen una IC_{50} mucho menor que la de la citarabina.

En un estudio con la línea de leucemia promielocítica HL-60 la IC_{50} para citarabina fue de 0.148 μ g/mL, mientras que la de idarrubicina, tan sólo fue de 0.09 μ g/mL (Davis *et al.*, 2016), demostrando que la antraciclina siempre es más potente sobre la citarabina para efectos antiproliferativos en diferentes tipos de leucemia. Sin embargo, existen evidencias que afirman que la actividad de estos dos fármacos también se ve reflejada en células troncales hematopoyéticas (Venton G, 2016).

El CS también inhibió la proliferación de las células WEHI-3 con una IC_{50} de 1.85 mg/mL, pero a diferencia de los tratamientos anteriores, se había reportado que el CS aumentaba la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas (Ledesma *et al.*, 2012), así procedimos a evaluar si la combinación con citarabina o daunorrubicina promovía el efecto antileucémico disminuyendo el daño a las células hematopoyéticas.

Obtuvimos que al combinar las IC_{25} de cada tratamiento todas aumentaron su actividad antiproliferativa en más del 20% comparado con las IC_{50} de los tratamientos independientes. Además de que la sumatoria del efecto inhibitorio de cada IC_{25} no sobrepasa el 47%, mientras que al combinar las dosis experimentalmente va más allá del 65%.

La combinación que potenció más la actividad de los dos tratamientos fue la de CS-dauno ya que la sumatoria del porcentaje de inhibición de cada uno era de tan solo 37% y al combinarlos alcanzó un 70%. Esto significa que podemos lograr un efecto antileucémico igual o mayor con dosis más pequeñas.

En el cultivo de CMN de MO de ratón BALB/c las células fueron estimuladas con las mismas dosis de IC_{25} e IC_{50} del ensayo anterior para ver como afectaban su proliferación. Generalmente los fármacos antineoplásicos no son selectivos hacia las células leucémicas y terminan por afectar a las células normales. En el ensayo las CMN de MO estimuladas con las IC_{25} e IC_{50} de CS aumentaron su proliferación más del 60% comparado con el control con rmlL-3, confirmado lo que reporta Ledesma en el 2013. La IC_{25} de citarabina no disminuyó significativamente la proliferación de estas células, al igual que la IC_{25} de daunorrubicina, sin embargo, la combinación de estos dos fármacos si mostró un efecto antiproliferativo de hasta un 30%. Esto quiere decir que la terapia combinada de citarabina y daunorrubicina no es selectiva y afecta a las células normales de MO.

Por otra parte, en las combinaciones tanto de citarabina como de daunorrubicina con el CS no se vio afectada la proliferación de las células, lo que sugiere que el CS disminuye el daño a las células de MO causado por la citarabina o incluso la daunorrubicina. Esto es importante ya que sabemos que el esquema de citarabina+daunorrubicina es efectivo en pacientes jóvenes, sin embargo, debido a la alta toxicidad de la daunorrubicina no puede ser administrada en todos los casos de LMA, sobre todo en los grupos más vulnerables de edad avanzada y/o citogenética y fenotipos desfavorables (Döhner *et al.*, 2017).

Para comprobar que el CS de sodio promovía la supervivencia de ratones leucémicos como lo indicó Ledesma E., en el 2013 se realizó un experimento con tres dosis de CS: 20% p/v, 10% p/v y 5% p/v. Los ratones leucémicos inoculados con CS al 10% p/v sobrevivieron cerca del día cuarenta y en mayor porcentaje que las otras dosis. Comprobando así lo ya reportado en la literatura. También se comprobó la efectividad de la citarabina y la daunorrubicina administradas individualmente, esta vez tomando como referencia la dosis clínica de cada fármaco (Rashe *et al.*, 2012).

La citarabina promovió la supervivencia hasta el día 38 en cerca del 10% de los ratones con la dosis clínica de 3mg/kg, resultando la más efectiva. La daunorrubicina por su parte prolongó la supervivencia hasta el día 40 en cerca del 38% de los ratones, esto, en la dosis de 0.5 mg/kg de peso, que es la mitad de la usada clínicamente, la cual solo llevó a poco más del 10% de los ratones hasta el día 40. En cuanto a la dosis más alta de daunorrubicina, los ratones murieron 10 días antes que los del grupo control WEHI-3 + y vehículo, confirmando la toxicidad de este fármaco.

Conocíamos que el CS promovía la granulopoyesis mediante el incremento de M-CSF, G-CSF y GM-CSF (Domínguez V. *et al.*, 2012). Actualmente una nueva alternativa de tratamiento para la LMA consiste en un régimen de citarabina, aclarubicina y el G-CSF (CAG) en dosis bajas (Wei *et al.*, 2011). El G-CSF influye en el microambiente de la médula ósea movilizándolo células T reguladoras (Tregs)

y células supresoras derivadas de mieloides (CSDMs). Además de promover el desalojo de las células leucémicas de su microambiente medular y/o la interrupción de la señalización, esto puede explicar el aumento de la muerte celular observada con citarabina y antraciclinas ya que, movilizandolas las células leucémicas, dejándolas desprotegidas de la MO son más susceptibles a estos fármacos (Di Tullio *et. al.*, 2017). Sabiendo que el CS aumenta las cantidades de G-CSF en suero y en médula ósea (Domínguez *et. al.*, 2012), era probable que al combinarlo con citarabina o daunorrubicina también movilizara las células leucémicas ancladas al nicho hematopoyético, llevándolas a torrente sanguíneo haciéndolas un blanco más fácil para la citarabina o daunorrubicina, aumentando su efectividad y promoviendo la supervivencia.

En la evaluación del efecto *in vivo* de las combinaciones: CS-cita, CS-dauno, cita-dauno, se obtuvo que todas aumentaban la sobrevivencia de los ratones por arriba de lo que lo hacían los tratamientos por si solos.

La combinación de la cita-dauno aumentó la sobrevivencia de los ratones hasta el día 50 apenas por encima de lo que lo hizo la daunorrubicina administrada individualmente, aunque en un mayor porcentaje (5% dauno vs 20% cita-dauno). El grupo tratado con la combinación de CS-citarabina contaba con cerca del 40% de los ratones vivos en el día cuarenta, y logró aumentar la sobrevivencia hasta el día 70 después de la inducción, 32 días más que la citarabina y 25 más que el CS, sin embargo, esto sólo fue en el 8% de los ratones.

El tratamiento más exitoso fue el de CS-dauno donde al día 50 sobrevivía el 40% de los ratones y se prolongó hasta el día 70 en el 20%, y contamos con dos ratones de este grupo, con más de 8 meses de sobrevivencia. Cabe recalcar que la daunorrubicina sola o en combinación se administró ininterrumpidamente cada 48 has. y a la mitad de la dosis que se utiliza clínicamente, contrario al esquema actual donde sólo se administra durante 3 días consecutivos, y si el paciente no entra en RC se da una segunda dosis con semanas de descanso de por medio.

Actualmente se ha visto que la quimioterapia metronómica que consiste en la administración regular y frecuente de dosis más bajas de medicamentos quimioterapéuticos con intervalos mínimos de tiempo libre de fármaco, establece una actividad prolongada y baja, aunque en un rango activo de concentración plasmática que permite un perfil de efectos secundarios favorable (Simsek *et al.*, 2019). De forma opuesta, los regímenes convencionales como el 7+3, se utilizan como dosis máxima tolerada (DMT), en la que se administran dosis relativamente altas con intervalos de 2-3 semanas (Rashe *et al.*, 2012). Es por esto que creemos que la disminución de la dosis de daunorrubicina y su combinación con el CS que disminuye los efectos secundarios y potencia la actividad antileucémica hicieron de este tratamiento el más exitoso.

En los estudios in-vivo del fármaco liposomal CPX-351 que también es una combinación de fármacos que se administra de forma constante y de liberación controlada en el organismo, el 100% de los ratones sobreviven más de 50 días después de la inducción de la leucemia, sin embargo, se usa la línea WEHI-3 para inducir ratones CD-1 desnudos, siendo que el origen de esta línea celular proviene de la sepa BALB/c (Tardi *et al.*, 2009). Abriendo la posibilidad de que el sistema inmunológico activo sea el que promueva la sobrevida y no el fármaco liposomal, por ello los resultados no son comparables en su totalidad.

Un estudio para tratar la LMA con un nuevo fármaco denominado MJ-29 (6-pyrrolidinyl-2-(2-hydroxyphenyl)-4-quinazolinone) que induce estrés en el retículo endoplásmico y apoptosis vía mitocondrial en las células WEHI-3, realizó las pruebas *in vivo* en ratones BALB/c inducidos con WEHI-3, en este estudio las células leucémicas fueron inoculadas vía intravenosa, y siete días después de la inducción comenzó el tratamiento con MJ-29 vía *i.p.* Al estar siete días en incubación los ratones control WEHI-3 + comenzaron a morir al día 6 de tratamiento u 11 desde la inducción, casi en la mitad del tiempo en el que lo hacen los de nuestro estudio, debido a que los ratones son tratados 48 horas después de la inducción. Al

final de este experimento los ratones tratados con MJ-29 en la dosis más alta, 20 mg/kg sobrevivieron hasta el día 35 después de la inducción, no administraron ningún otro fármaco para comparar la eficacia, pero ningún ratón sobrevivió a la LMA. Aunque el diseño experimental fue distinto, nuestra combinación alcanza mayor supervivencia que MJ-29 además de contar con ratones sobrevivientes (Lu *et. al*, 2012).

Al día 30 después del inicio del tratamiento se sacrificó un ratón de cada grupo para obtener la MO y analizar si aún había células autoproferantes, después de 120 h de cultivo las células de todos los grupos inducidos con la LMA continuaban proliferando aún en ausencia de rmlL-3 con excepción de la dosis de cita-dauno, esto podría indicar que es el tratamiento más eficaz, sin embargo, tampoco proliferaban en presencia de rmlL-3 indicando daño a las células normales de MO.

En el tratamiento de CS-cita, aunque aún proliferaban sin rmlL-3 también había una disminución de la proliferación en ambas condiciones comparado con el control WEHI-3 +, esto fue una sorpresa ya que la daunorrubicina sola o en combinación con el CS no disminuyó la proliferación, siendo que según la literatura es el fármaco más tóxico. Al día 60 se repitió el ensayo con los ratones de los tratamientos sobrevivientes, CS-cita y CS-dauno. Las CMN provenientes de la MO del ratón tratado con CS-cita no proliferaron en presencia o ausencia de rmlL-3, indicando un daño evidente a la MO. Por otro lado, las células del ratón tratado con CS-dauno si proliferaron en presencia de rmlL-3, y en su ausencia, la proliferación es un poco más elevada comparada con la de las células provenientes de un ratón sano sin tratamiento, sin llegar a ser significativamente diferente.

Al momento de obtener la MO los ratones del tratamiento de cita-dauno presentaban una alta fragilidad ósea, que va relacionado a la afectación del nicho hematopoyético (Li *et al.*, 2015). Aunque esto derivó en la imposibilidad de evaluar la morfología celular, su cultivo *ex vivo*, anteriormente mencionado, si fue posible, donde las CMN de MO no proliferaban aún en presencia de rmlL-3, esto puede

confirmar el daño de esta combinación de fármacos a la MO, aunque no directamente a las células si no a su microambiente.

Se realizó un cultivo para comprobar si las células de la MO eran capaces de proliferar, diferenciarse y formar colonias, aún después de los 70 días de tratamiento. Las CMN de MO del ratón tratado con CS-cita, no proliferaron en ausencia de IL-3, y aunque si proliferaban en su presencia, la formación de colonias es muy reducida y las células tenían una morfología homogénea poco diferenciada. Esto quiere decir que hay un daño a la MO, y que, a pesar de la supervivencia prolongada de los ratones, la citarabina daña las células hematopoyéticas aún en presencia del CS.

En el cultivo de las células del ratón tratado con CS-daño las células cultivadas en presencia de IL-3 podemos ver una aumentada proliferación en comparación con el cultivo de un ratón sano, se puede observar gran formación de colonias y morfología heterogénea. Cultivadas sin IL-3, las células continúan proliferando, lo que nos dice que las células son autoproliferantes, por otro lado, también hay formación de colonias y la morfología celular no es homogénea. La proliferación en ausencia de IL-3 podría indicar que hay presencia de células leucémicas WEHI-3, sin embargo, sabemos que el CS induce a la producción de citocinas en ratones sanos (Santiago *et al.*, 2010) por lo que desconocemos si este efecto es por el tratamiento de CS; su administración prolongada en ratones leucémicos podría permitir que las células normales de MO produzcan factores que aumenten la proliferación, formación de colonias y diferenciación aún en medios no estimulados con IL-3.

La suma de estos datos nos sugiere que al administrar el tratamiento de CS-daño en ratones leucémicos se propicia la producción de citocinas en la cavidad peritoneal que viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar a la MO lo que promueve la proliferación de las células hematopoyéticas sanas, por otro lado, la combinación de estos fármacos promueve la eliminación de las células leucémicas circulantes y

en médula ósea, favoreciendo la supervivencia de ratones leucémicos sin crecimiento de células autoproliferantes (Figura 14).

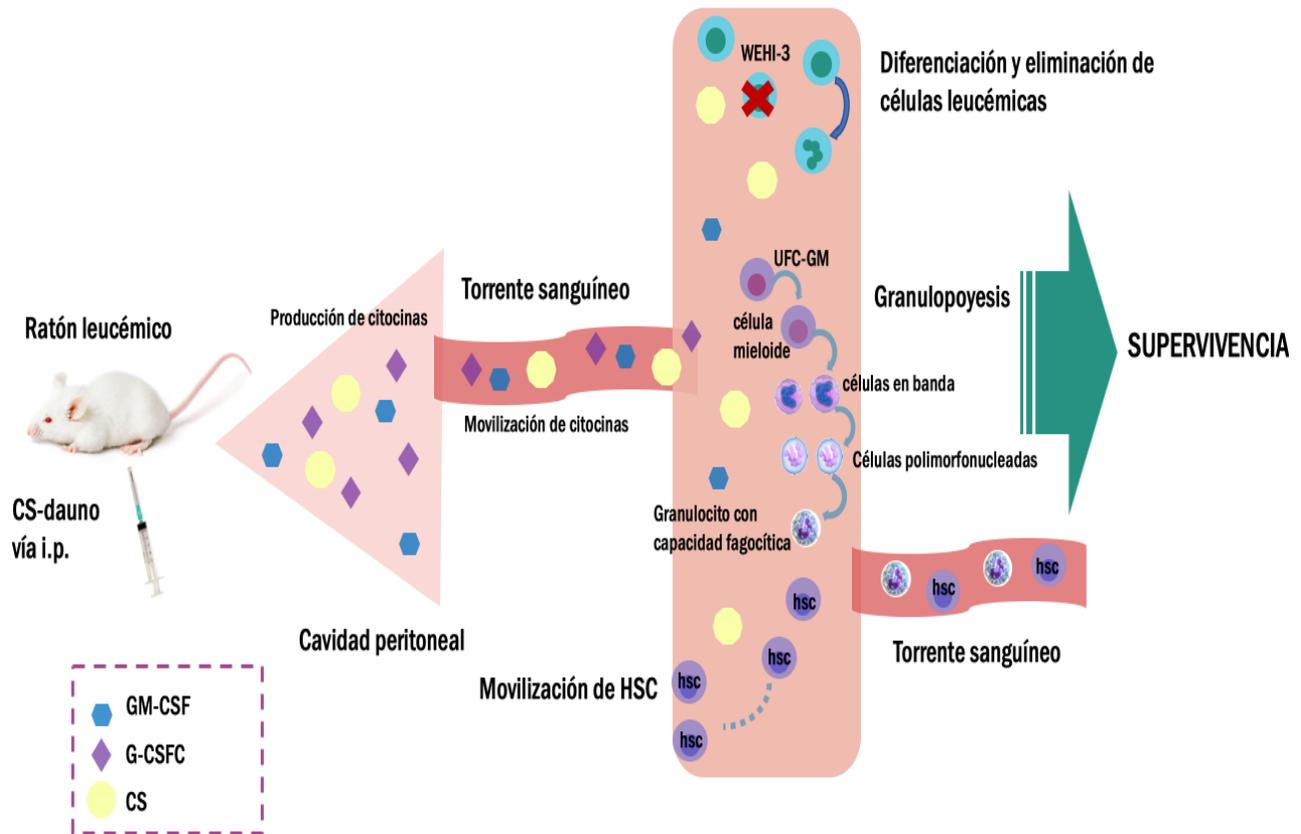


Figura 14. Propuesta de mecanismo de acción del tratamiento CS-daunorrubicina.

13. Conclusiones

El caseinato de sodio combinado con la citarabina o la daunorrubicina en sus IC25 muestran un efecto sinérgico para la inhibición de la proliferación de células de LMA. Alcanzando un 65% y 70% de porcentaje de inhibición respectivamente, contrario al 50% que resultaría si el efecto fuera aditivo. Esto no ocurre al usar estas mismas dosis sobre CMN de MO de ratón normal, por el contrario, el CS por si solo promueve la proliferación, mientras que en combinación con citarabina o daunorrubicina no afectan ni promueven su proliferación, contrario a la combinación convencional de citarabina y daunorrubicina donde las células dejan de proliferar. Esto demuestra que con dosis más pequeñas de citarabina o daunorrubicina combinadas con el CS podemos alcanzar un mayor efecto antileucémico sin afectar las células normales.

Los ratones tratados con CS-citarabina sobreviven 40% más que los tratados con citarabina y daunorrubicina sin embargo muestran daño en la MO. Mientras que al tratarlos con CS-daunorrubicina sobreviven más de 8 meses sin rastros de enfermedad ni daño a la MO por la administración del fármaco. Esto quiere decir que el caseinato de sodio combinado con la daunorrubicina en dosis bajas puede ser una alternativa para el tratamiento de LMA donde el efecto antileucémico sea mayor, disminuyendo la probabilidad de daño a las células normales de la médula ósea.

14. Bibliografía

- Aguilar López, L., León Cantú, R. E., Pérez Lozano, U., Montaña Figueroa, E. H., Terreros Muñoz, E., & Martínez Murillo, C. (2010). Guía de Práctica Clínica. *Diagnóstico y tratamiento de la leucemia mieloide aguda*.
- American Cancer Society, 2019. Recuperado de: <https://www.cancer.org/cancer/leukemia.html>
- Arber, D. A., Glader, B., List, A. F., Means, R. T., Paraskevas, F., & Rodgers, G. M. (2013). *Wintrobe's clinical hematology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Argüelles Ruiz G.J. (2011). *Fundamentos de Hematología*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Cordova-Galaviz, Y., Ledesma-Martinez, E., Aguiniga-Sanchez, I., Soldevila-Melgarejo, G., Soto-Cruz, I., Weiss-Steider, B., & Santiago-Osorio, E. (2014). Sodium caseinate induces increased survival in leukaemic mouse J774 model. *In Vivo*, 28(5), 819-825.
- Davis, C. T., Rao, A. V., Guadalupe, E., Chistensen, D. J., & Weinberg, J. B. (2016). Fingolimod Is Cytotoxic in Acute Myeloid Leukemia Independent of Additional Chemotherapeutic Agents. *Blood*, 128(22), 5126. Accessed April 02, 2019. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/5126>.
- De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood cancer journal*, 6(7), e441.
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., & Levine, R. L. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, 129(4), 424-447.
- Di Tullio, A., Rouault-Pierre, K., Abarrategi, A., Mian, S., Grey, W., Gribben, J., & Bonnet, D. (2017). The combination of CHK1 inhibitor with G-CSF

overrides cytarabine resistance in human acute myeloid leukemia. *Nature communications*, 8(1), 1679.

- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., DiPersio, J. F. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukemia revealed by whole genome sequencing. *Nature*, 481(7382), 506–510.
- Dombret, H., & Gardin, C. (2016). An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*, 127(1), 53-61.
- Domínguez-Meléndez, V., Silvestre-Santana, O., Moreno-Fierros, L., Aguiñiga-Sánchez, I., Martínez, L., Marroquin-Segura, R., & Mora-García, L. (2012). Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis. *Inflammation Research*, 61(4), 367-373.
- Dorshkind, K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annual review of immunology*, 8(1), 111-137.
- Efficace, F., Mandelli, F., Borlenghi, E., Breccia, M., Rambaldi, A., Specchia, G., & Angelucci, E. (2016). Health Related Quality of Life of Long-Term Survivors of Acute Promyelocytic Leukemia Treated with All-Trans Retinoic Acid and Chemotherapy.
- Ehninger, A., & Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 421-428.
- Fernández, I. I. (2017). Nuevas drogas y tratamiento de baja intensidad en leucemia mieloide aguda (LMA). *Hematología*, 21, 34-40.
- Gallipoli, P., & Leach, M. (2007). Gingival infiltration in acute monoblastic leukaemia. *British dental journal*, 203(9), 507.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*, 6(3), 1769-1792.
- Irons, R. D., & Stillman, W. S. (1996). The process of leukemogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 104(6), 1239-1246.

- Kumar, V. Abbas, A. Aster, J. (2015). Neoplasias. En: Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editores. Robbins y Cotran Compendio de Patología Estructural y Funcional. 9a ed. Barcelona: Elsevier Espana; p. 265---340.
- Lancet, J. E. (2018). Is the overall survival for older adults with AML finally improving?. *Best Practice & Research Clinical Haematology*.
- Lancet, J. E., Uy, G. L., Cortes, J. E., Newell, L. F., Lin, T. L., Ritchie, E. K., & Stone, R. M. (2018). CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) liposome for injection versus conventional cytarabine plus daunorubicin in older patients with newly diagnosed secondary acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 36(26), 2684.
- Larrosa-Garcia, M., & Baer, M. R. (2017). FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: current status and future directions. *Molecular cancer therapeutics*, 16(6), 991-1001.
- Ledesma-Martínez, E., Pérez-Cordero, C., Córdova-Galaviz, Y., Sánchez-Tellez, G., Huerta-Yepey, S., Aguiñiga-Sánchez, I., & Santiago-Osorio, E. (2012). Casein induces the proliferation of bone marrow mononuclear cells, apoptosis of WEHI-3 leukaemic cells and increased survival in a leukaemia mouse model. *Oncology Letters*, 4(3), 461-466.
- Ledesma Martínez, E. (2013). Efecto *in vitro* e *in vivo* del caseinato de sodio (CasNa) en la proliferación de células leucémicas wehi-3 y células de médula ósea normal de ratón. Tesis doctoral, UNAM.
- Ledesma-Martínez, E., Pérez-Cordero, C. L., Sánchez-Tellez, G., Aguiñiga-Sánchez, I., Córdova-Galaviz, Y., Weiss-Steider, B., & Santiago-Osorio, E. (2013). The role of CasNa in the selective elimination of leukemic cells. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 16(1), 5-8.
- Ledesma-Martínez, E., Pérez-Cordero, C., Córdova-Galaviz, Y., Sánchez-Tellez, G., Huerta-Yepey, S., Aguiñiga-Sánchez, I., & Santiago-Osorio, E. (2012). Casein induces the proliferation of bone marrow mononuclear cells,

apoptosis of WEHI-3 leukaemic cells and increased survival in a leukaemia mouse model. *Oncology Letters*, 4(3), 461-466.

- Leopold, L.H. and R. Willemze, The treatment of acute myeloid leukemia in first relapse: a comprehensive review of the literature. *Leukemia & Lymphoma*, 2002. 43(9): p. 1715-1727.
- Li, J., Chen, Y., Zhu, Y., Zhou, J., Xu, Y., Li, Y., & Gu, J. (2015). Efficacy and safety of decitabine in combination with G-CSF, low-dose cytarabine and aclarubicin in newly diagnosed elderly patients with acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 6(8), 6448.
- Li, S., Zou, D., Li, C., Meng, H., Sui, W., Feng, S., ... & Qiu, L. (2015). Targeting stem cell niche can protect hematopoietic stem cells from chemotherapy and G-CSF treatment. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 175.
- López-karpovich, X., Hematopoyesis. In: Fernández-Tresguerres J. A, Ariznavarreta C, Cachofeiro V, Cardinali D, Escriche E., Gil-Loyzaaga P., Lahera V., Mora F, Romano M, Tamargo J. (2010) Fisiología humana, 4e. New York, NY: McGraw-Hill
- Lu, C. C., Yang, J. S., Chiang, J. H., Hour, M. J., Lin, K. L., Lin, J. J., & Chung, J. G. (2012). Novel quinazolinone MJ-29 triggers endoplasmic reticulum stress and intrinsic apoptosis in murine leukemia WEHI-3 cells and inhibits leukemic mice. *PloS one*, 7(5), e36831.
- Lubieniecka, J. M., Graham, J., Heffner, D., Mottus, R., Reid, R., Hogge, D., & Riggs, W. K. (2013). A discovery study of daunorubicin induced cardiotoxicity in a sample of acute myeloid leukemia patients prioritizes P450 oxidoreductase polymorphisms as a potential risk factor. *Frontiers in genetics*, 4, 231.
- Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Pelayo, R., Montesinos, J. J., Flores-Guzmán, P., & Chávez-González, A. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología*, 2(2), 95-107.

- Mayani, H., Guilbert, L. J., & Janowska-Wieczorek, A. (1992). Biology of the hemopoietic microenvironment. *European Journal of Haematology*, 49(5), 225-233.
- Megías-Vericat, J. E., Martínez-Cuadrón, D., Sanz, M. Á., Poveda, J. L., & Montesinos, P. (2019). Daunorubicin and cytarabine for certain types of poor-prognosis acute myeloid leukemia: a systematic literature review. *Expert review of clinical pharmacology*, 12(3), 197-218.
- Metcalf, D. (1993). Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?. *Blood*, 82(12), 3515-3523.
- Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood*, 111(2), 485-491.
- Meyer SC, Levine RL (2014). Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncology*, 15: e382---94
- Monroya, R. H., Estrada, B. S., & Vargas Viveros, P. (2012). Leucemia para el médico general. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 55(2), 11-25.
- Orkin, S. H., & Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132(4), 631-644.
- Pantoja, M. D., Romero-Ramirez, H., & Alba, J. C. R. (2015). Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 15(1), 29-37.
- Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V. I., Paschka, P., Roberts, N. D., & Gundem, G. (2016). Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(23), 2209-2221.
- Pollyea, D. A., Tallman, M. S., de Botton, S., Kantarjian, H. M., Collins, R., Stein, A. S., & MacBeth, K. J. (2019). Enasidenib, an inhibitor of mutant IDH2 proteins, induces durable remissions in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1.
- Rabbitts, T. H. (1991). Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell*, 67(4), 641-644.

- Ramos-Mandujano, G., Weiss-Steider, B., Melo, B., Córdova, Y., Ledesma-Martínez, E., Bustos, S., ... & Sánchez, L. (2008). Alpha-, beta-and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiology*, 213(2), 133-141.
- Rasche, M., Zimmermann, M., Borschel, L., Bourquin, J. P., Dworzak, M., Klingebiel, T., & Reinhardt, D. (2018). Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. *Leukemia*, 32(10), 2167.
- Renneville, A., Roumier, C., Biggio, V., Nibourel, O., Boissel, N., Fenaux, P., & Preudhomme, C. (2008). Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*, 22(5), 915.
- Santiago-Osorio, E., et al., Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology*, 2010. 215(4): p. 332-339.
- Santiago-Osorio, E., Ledesma-Martínez, E., Aguiñiga-Sánchez, I., Poblano-Pérez, I., Weiss-Steider, B., Montesinos-Montesinos, J. J., & de Lourdes Mora-García, M. (2015). Sodium caseinate (CasNa) induces mobilization of hematopoietic stem cells in a BALB/c mouse model. *Medical Science Monitor Basic Research*, 21, 206.
- Santiago-Osorio, E., Mora, L., Bautista, M., Montesinos, J. J., Martínez, I., Ramos-Mandujano, G., & Aguiñiga, I. (2010). Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology*, 215(4), 332-339.
- Saultz, J. N., & tardi, R. (2016). Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *Journal of Clinical Medicine*, 5(3), 33.
- Scadden DT, Longo DL. Células madre hematopoyéticas. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. eds. *Harrison. (2016). Principios de Medicina Interna, 19e* New York, NY: McGraw-Hill;

- Simsek, C., Esin, E., & Yalcin, S. (2019). Metronomic Chemotherapy: A Systematic Review of the Literature and Clinical Experience. *Journal of Oncology*, 2019.
- Sperr, W. R., Herndlhofer, S., Gleixner, K., Girschikofsky, M., Weltermann, A., Machherndl-Spandl, S., & Hoermann, G. (2017). Intensive consolidation with G-CSF support: Tolerability, safety, reduced hospitalization, and efficacy in acute myeloid leukemia patients \geq 60 years. *American journal of hematology*, 92(10), E567-E574.
- Tardi, P., Johnstone, S., Harasym, N., Xie, S., Harasym, T., Zisman, N., & Mayer, L. (2009). In vivo maintenance of synergistic cytarabine: daunorubicin ratios greatly enhances therapeutic efficacy. *Leukemia research*, 33(1), 129-139.
- Tsai, C. H., Hou, H. A., Tang, J. L., Liu, C. Y., Lin, C. C., Chou, W. C., & Liu, C. W. (2016). Genetic alterations and their clinical implications in older patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 30(7), 1485.
- Venton, G., Pérez-Alea, M., Baier, C., Fournet, G., Quash, G., Labiad, Y., & Farnault, L. (2016). Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors. *Blood Cancer Journal*, 6(9), e469.
- Villeneuve, P., Kim, D. T., Xu, W., Brandwein, J., & Chang, H. (2008). The morphological subcategories of acute monocytic leukemia (M5a and M5b) share similar immunophenotypic and cytogenetic features and clinical outcomes. *Leukemia research*, 32(2), 269-273.
- Wei, G., Ni, W., Chiao, J. W., Cai, Z., Huang, H., & Liu, D. (2011). A meta-analysis of CAG (cytarabine, aclarubicin, G-CSF) regimen for the treatment of 1029 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Journal of Hematology & Oncology*, 4(1), 46.
- Yamamoto, J. F., & Goodman, M. T. (2008). Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997–2002. *Cancer Causes & Control*, 19(4), 379-390.

- Yates, J. W. (1973). Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother. Rep.*, 57, 485-488.
- Yogarajah, M., & Stone, R. M. (2018). A concise review of BCL-2 inhibition in acute myeloid leukemia. *Expert Review of Hematology*, 11(2), 145-154.
- Zhou, B. O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J. J., Naveiras, O., & Morrison, S. J. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nature Cell Biology*, 19(8), 891.