



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE HEMATOPOYESIS Y LEUCEMIA

MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES/PROGENITORAS

HEMATOPOYÉTICAS EN RATONES TRATADOS CON CASEINATO DE SODIO

(CasNa)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

POBLANO PÉREZ LUIS IGNACIO



DIRECTOR DE TESIS: Dr. Edelmiro Santiago Osorio

México D.F. 3 de Junio de 2014

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), de la Facultad de Estudios Superiores 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) con clave: IN225610 e IN220814 y beca de estudiante del proyecto IN225610.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, y guiar este trabajo de tesis, así como su apoyo, confianza y paciencia que me ha brindado durante mi estancia.

Al Dr. Edgar Ledesma Martínez por su apoyo y su gran ayuda para poder resolver todas mis dudas tanto en la teoría como en la práctica, sin importar que tan grandes fueran, muchas gracias.

A la M. en C. Itzen Aguiñiga por todo su apoyo y confianza así como toda su ayuda en la parte experimental.

A todos y cada uno de los miembros del Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, gracias por el valioso apoyo brindado, yo solo nunca hubiese podido realizar este trabajo sin su ayuda.

A los miembros del jurado

M en C. Luis Sánchez Sánchez

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dr. Edgar Ledesma Martínez

M. en C. Itzen Aguiñiga Sánchez;

Quienes con sus valiosas aportaciones enriquecieron y guiaron para la culminación de este trabajo.

Al Bioterio de la FES-Zaragoza, UNAM, por el apoyo brindado, con el suministro de animales para este trabajo, en especial a la MVZ. Adriana Altamirano Bautista.

Al IIB, UNAM, por el apoyo brindado para utilizar el equipo necesario para realizar la parte experimental de este trabajo, principalmente al Q.F.B. Carlos Castellanos Barba por su apoyo y atenciones recibidas durante la irradiación de animales experimentales.

DEDICATORIAS

A mi madre por todo, por su ayuda, sus cuidados, sus consejos, por todo lo que ha hecho y dado por mí, porque nunca tendré las suficientes palabras o acciones para agradecerte lo que has sido, eres y serás siempre en mi vida, simplemente muchas gracias, por ser MI MADRE.

A mi padre por lo poco y mucho que me enseñaste mientras estuvimos juntos y que hoy cuando lo recuerdo me ayudan a ser mejor persona, estoy orgulloso de ser tu hijo.

A todos y cada uno de mis hermanos y hermanas por todo su apoyo y porque todos me han enseñado algo para no rendirme en la vida, sobre todo me enseñaron que la vida no es fácil cuando eres el menor de los 6 hermanos

A mis sobrinos y sobrina, por hacerme creer que soy el mejor de los tíos, gracias por alegrarme la vida cuando los veo sonreír.

A mis cuñados y cuñadas por su apoyo.

A mis amigos de la prepa que aún después de tantos años puedo seguir llamando amigos, y a mis amigos de la universidad con los que he vivido todas las experiencias que un Biólogo puede tener en el campo o en el laboratorio, gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Hematopoyesis</i>	1
1.1.1 Células troncales	1
1.1.2 Células progenitoras	2
1.2 <i>Microambiente hematopoyético</i>	5
1.2.1 Citocinas	5
1.2.3 Nicho hematopoyético	6
1.3 <i>Movilización de células troncales y progenitoras hematopoyéticas</i>	9
1.3.1 Movilización Fisiológica y Homing	9
1.3.2 Movilización inducida.	12
1.4 <i>El trasplante de HSC movilizadas</i>	15
1.5 <i>Caseínas y movilización de HSC/HPC.....</i>	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS.....	21
6. MATERIAL Y MÉTODO.....	22
6.1 <i>Animales</i>	22
6.2 <i>Tratamiento de los ratones y aislamiento de las células mononucleadas....</i>	22
6.3 <i>Determinación del índice esplénico.....</i>	23
6.4 <i>Ensayo de unidades formadoras de colonias</i>	23
6.5 <i>Estandarización de la dosis de radiación supraletal.....</i>	23
6.6 <i>Radiación y trasplante.....</i>	24
6.7 <i>Criterios de efectividad de trasplante</i>	25
6.8 <i>Manejo de datos.....</i>	25
7. RESULTADOS.....	26
7.1 <i>La inoculación de CasNa aumenta el número de células mononucleadas en sangre periférica de ratones sanos</i>	26
7.2 <i>La inoculación de CasNa aumenta el tamaño del bazo en ratones sanos...</i>	27

7.3 La inoculación de CasNa aumenta el número de células progenitoras en sangre periférica	29
7.4 La exposición de ratones a la radiación de 8.5 o 9.5 Grays induce mieloablación	32
7.5 El trasplante de células mononucleadas de sangre periférica de ratones tratados con CasNa, induce una mayor supervivencia en ratones irradiados letalmente	37
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
9. CONCLUSIONES	48
10. PERSPECTIVAS	49
11. BIBLIOGRAFÍA	50
12. ANEXOS	67
<i>Preparación de reactivos:</i>	<i>67</i>
<i>Manejo de los animales</i>	<i>69</i>
13. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS	70

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Agentes movilizadores utilizados clínica o experimentalmente.

Tabla 2. La exposición de ratones a la radiación gamma induce signos físicos notables.

Tabla 3. La exposición de ratones a la radiación gamma induce pérdida de peso.

Figuras

Figura 1. Jerarquía de la hematopoyesis.

Figura 2. CasNa aumenta el número de células mononucleadas en sangre periférica de ratones.

Figura 3. CasNa aumenta el tamaño de los bazo en ratones.

Figura 4. CasNa aumenta el índice esplénico en ratones

Figura 5. CasNa aumenta el número de progenitores en sangre periférica.

Figura 6. CasNa tiene el potencial de formar colonias

Figura 7. CasNa aumenta el número de progenitores de diferentes linajes hematopoyéticos en sangre periférica.

Figura 8. La exposición de ratones a la radiación gamma induce su muerte.

Figura 9. La exposición de ratones a la radiación gamma induce daño en sus órganos internos.

Figura 10. La exposición de ratones a la radiación gamma induce pérdida de peso.

Figura 11. El trasplante permite la recuperación del peso de ratones irradiados.

Figura 12. El trasplante de CMN de SP y MO de ratones tratados con CasNa aumenta la supervivencia de ratones letalmente irradiados.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang-1	Angiopoyetina 1
ATRA	Ácido todo transretinoico*
BFU-E	Unidad formadora de brotes de eritrocitos*
BFU-Mk	Unidad formadora de brotes de megacariocitos*
CasNa	Caseinato de sodio
CFU	Unidades formadoras de colonias*
CFU-Bas	Unidad formadora de colonias de basófilos*
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides*
CFU-Eos	Unidad formadora de colonias de eosinófilos*
CFU-G	Unidad formadora de colonias de granulocitos*
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulocito-macrófago*
CFU-GEMM	Unidad formadora de colonias granulocito-eritroide-monocitos-megacariocitos*
CFU-Mas	Unidad formadora de colonias de mastocitos*
CFU-MDC	Unidad formadora de colonias de células dendríticas-macrófagos*
CFU-Meg	Unidad formadora de colonias de megacariocitos*
CLP	Progenitores linfoides comunes*
CMN	Células mononucleadas
CMP	Progenitores mieloides comunes*
¹³⁷ Cs	Isotopo radiactivo Cesio 137
CSF	Factores estimuladores de colonias*
CXCR4	Receptor CXC-4*
Epo	Eritropoyetina

FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos*
FLT3	Ligando de la tirosina quinasa 3*
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos*
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos*
Gro- β	Proteína de crecimiento reguladora beta*
GVHD	Enfermedad injerto contra huésped*
Gy	Gray
HE	Hematopoyesis extramedular
HPC	Células progenitoras hematopoyéticas
HSC	Células troncales hematopoyéticas
HSC-ST	Células troncales hematopoyéticas a corto plazo*
HSC-LT	Células troncales hematopoyéticas a largo plazo*
IACUC	El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales*
IFN- β	Interferón-beta*
IL	Interleucina
KSL	Inmunofenotipo de HSC/HPC c-kit*, Ska-1 ⁺ , Lin- [*]
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos*
MEC	Matriz extracelular
MO	Médula ósea
MPP	Progenitoras multipotentes*
NK	Células asesinas naturales*
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos*
Pro-B	Progenitores de linfocitos B
Pro-DC	Progenitores de células dendríticas
Pro-NK	Progenitores de células asesinas naturales

Pro-T	Progenitores de linfocitos T
rhGH	La hormona de crecimiento recombinante humana*
rhPTH	La hormona paratiroidea recombinante humana*
SCF	Factor de células troncales*
rmSCF	Factor de células troncales recombinante de ratón*
SDF-1	Factor derivado del estroma*
SP	Sangre periférica
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa*
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta*
Tpo	Trombopoyetina
VLA-4	Antígeno muy tardío-4*

*por sus siglas en inglés

RESUMEN

El trasplante de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSC/HPC) es el método para reconstituir la médula ósea (MO) normal en pacientes que recibieron un régimen de quimioterapia o radioterapia para el tratamiento contra varios tipos de cáncer, enfermedades hematológicas, metabólicas y autoinmunes. En principio la fuente de HSC para trasplante fue la MO, sin embargo debido a diversos inconvenientes, surgió la necesidad de buscar otras fuentes de células para reconstitución hematopoyética, entre ellas la sangre periférica (SP), pero bajo condiciones normales encontramos un bajo número de HSC/HPC insuficientes para realizar un trasplante, gracias a la ayuda de diversos movilizadores podemos aumentar este número de HSC/HPC en SP, aunque por diversos motivos estos movilizadores tienden a fallar y por lo cual se requiere la investigación de nuevos agentes capaces de movilizar el número de HSC/HPC necesario para el trasplante. Se ha demostrado que el caseinato de sodio (CasNa) es capaz de regular la hematopoyesis medular, aumentar los niveles del factor de estimulante de colonias de granulocitos y granulocitos-macrófagos y recientemente demostró su capacidad de aumentar el número de células mononucleadas en SP las cuales presentaban el inmunofenotipo de HSC/HPC (c-kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻), en este trabajo mediante unidades formadoras de colonias mostramos que CasNa presenta una capacidad similar de movilización a un movilizador comercial altamente usado en la clínica, el AMD3100, aunado a esto demostramos que estas células movilizadas desarrollaban la prueba contundente de su funcionalidad como HSC/HPC al rescatar y prolongar en mayor porcentaje la supervivencia de ratones letalmente irradiados en comparación al trasplante de células movilizadas con AMD3100 y un trasplante convencional de MO. Estos resultados sugieren que CasNa podría ser utilizado como una nueva y potencial alternativa terapéutica para la movilización y el trasplante de HSC/HPC.

ABSTRACT

The transplantation of stem and progenitor hematopoietic (HSC/HPC) cells is the method to reconstitute normal bone marrow (BM) in patients receiving chemotherapy or radiotherapy regimen for the treatment of various cancers, and hematologic, metabolic and autoimmune diseases. Source of hematopoietic stem cells for transplantation was BM, however due to various drawbacks, it became necessary to seek other sources of cells for hematopoietic reconstitution, including peripheral blood (PB). Under normal conditions HSC was found a low number on PB, insufficient for a transplant, but with the help of various mobilizing can be increase the number of HSC/HPC in PB. For various reasons these movers tend to fail and which requires investigating new agents capable of mobilizing the number of HSC/HPC needed for transplantation. It has been shown that sodium caseinate (CasNa) is capable of regulating marrow hemopoiesis, increasing levels of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage and recently demonstrated the ability to increase the number of mononuclear cells in PB which had the immunophenotype of HSC/HPC (Sca-1⁺, c-kit⁺, Lin⁻), in this study using colony forming units show that CasNa had a similar ability to mobilize a commercial mobilizing highly used in the clinic, the AMD3100, coupled with this we show that these mobilized cells showed the strongest evidence of its functionality as HSC/HPC to rescue and prolong survival in a higher percentage of lethally irradiated mice compared to cell transplantation mobilized with AMD3100 or transplantation of progenitor conventional BM. These results suggest that CasNa could be used as a new potential therapeutic alternative for the mobilization and transplantation of HSC/HPC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hematopoyesis

1.1.1 Células troncales

La sangre contiene diferentes tipos de células y cada una tiene una función biológica específica; Los eritrocitos transportan el oxígeno; los granulocitos y monocitos juegan un papel clave en la inflamación y la fagocitosis, las plaquetas intervienen en la hemostasia; los linfocitos median la inmunidad específica contra microorganismos y otras fuentes de macromoléculas extrañas al organismo. A pesar de las diferencias estructurales y funcionales de las células de la sangre, existe una fuerte evidencia de que todas las células de la sangre son la progenie de un único tipo de células, las células troncales hematopoyéticas (HSC).

Los procesos implicados en la producción de todas las diversas células de la sangre a partir de las HSC son llamados colectivamente hematopoyesis (Mayani *et al.*, 2007; Wintrobe, 2009).

La hematopoyesis puede ser esquematizada de manera que podemos observar 4 compartimentos principales, el primer compartimiento pertenece al de las HSC, las cuales se definen como células inmaduras, no diferenciadas, que contienen la potencialidad de auto-renovación, gran potencial de proliferación, la capacidad de diferenciación en células sanguíneas especializadas y tienen la capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético de un individuo mielosuprimido (Mayani, 2003, 2007; Orkin & Zon, 2008; Wintrobe, 2009; Chotinantakul & Leraanansaksiri, 2012) y corresponde a menos del 0.01% del total de las células nucleadas de la médula ósea (MO) (Pelayo y Vadillo, 2011).

Debido a su potencial de reconstitución se clasifican 2 tipos de HSC, las HSC de largo plazo (HSC-LT) y las HSC de corto plazo (HSC-ST), ambas tienen la capacidad de dar lugar a cualquier linaje sanguíneo, sin embargo las primeras son capaces de sostener la hematopoyesis de un individuo toda su vida, en cuanto a las segundas solo pueden mantenerla entre 8 a 16 semanas, (Weisman, 2000;

Orkin & Zon, 2008; Benveniste *et al.*, 2010; Challen *et al.*, 2010; de Kruijf *et al.*, 2010; Mayle *et al.*, 2012; Schuettpeitz & Link, 2012; Montrone *et al.*, 2013). A la vez las HSC son dirigidas por citocinas con las cuales determinan si se mantendrán en estado quiescente o comenzarán su diferenciación hacia algún linaje hematopoyético dando lugar al siguiente compartimento el cual corresponde al progenitor (Sarrazin & Sieweke, 2011).

1.1.2 Células progenitoras

En 1994 se demostró que existen tres tipos de poblaciones multipotentes; las HSC-LT, HSC-ST y su progenie directa las células progenitoras multipotentes (MPP), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación y por lo tanto su capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético a largo plazo pero conservan su potencial proliferativo, constituyen más del 0.5% del total de células de la MO; comparten ciertas características inmunofenotípicas con las HSC, tienen la capacidad de diferenciarse a todos los linajes sanguíneos, mientras sus descendientes restringen sus potenciales de diferenciación y experimentan paralelamente cambios en los inmunofenotipos que los distinguen de las células primitivas, más abajo en la cascada hematopoyética encontramos los progenitores oligopotenciales, que son los progenitores linfoides comunes (CLP) y los progenitores mieloides comunes (CMP), este es el tercer compartimiento y a este pertenecen más del 90% de las células residentes en la MO, a su vez, de los CMP se originan los progenitores de eritrocitos y megacariocitos (MEP) y los progenitores de granulocitos-macrófagos (GMP). Los CLP darán origen a los progenitores de linfocitos B (Pro-B), progenitores de linfocitos T (Pro-T) y los progenitores de células asesinas naturales (Pro-NK). Ambos, CMP y CLP pueden dar origen a los progenitores de células dendríticas (Pro-CD), una vez que estos maduren completamente darán lugar al cuarto compartimento que son las plaquetas, eritrocitos, granulocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T y las células asesinas naturales (Figura 1), (Mayani *et al.*, 2007; Challen *et al.*, 2009; Seita & Weissman, 2010; Pelayo y Vadillo, 2011).

Las HSC y las células progenitoras hematopoyéticas (HPC) pueden ser identificadas usando marcadores específicos, una característica que define a los progenitores inmaduros es que no expresan ninguno de los marcadores específicos de los distintos linajes maduros, por lo cual se consideran Lin⁻, los marcadores c-Kit⁺ y Sca-1⁺ suponen un paso más allá en la purificación de las HSC de ratón, con mucho la especie en que los distintos progenitores hematopoyéticos están mejor caracterizados. Las células c-kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ (o simplemente KSL) indican una mayor troncalidad en las células de ratón. Aun así, sólo una de cada 10 células KSL es una HSC (Barquinero, 2009). Más abajo en la cascada hematopoyética se expresan marcadores de linaje que caracterizan a cada uno de los diferentes tipos celulares. Finalmente la regulación de las HSC y el control de su quiescencia, proliferación, auto-renovación, diferenciación, muerte celular y migración dependen del microambiente específico en el que residen. (Forgáčová & Nečas, 2012; Ugarte & Forsberg, 2013).

Cascada hematopoyética

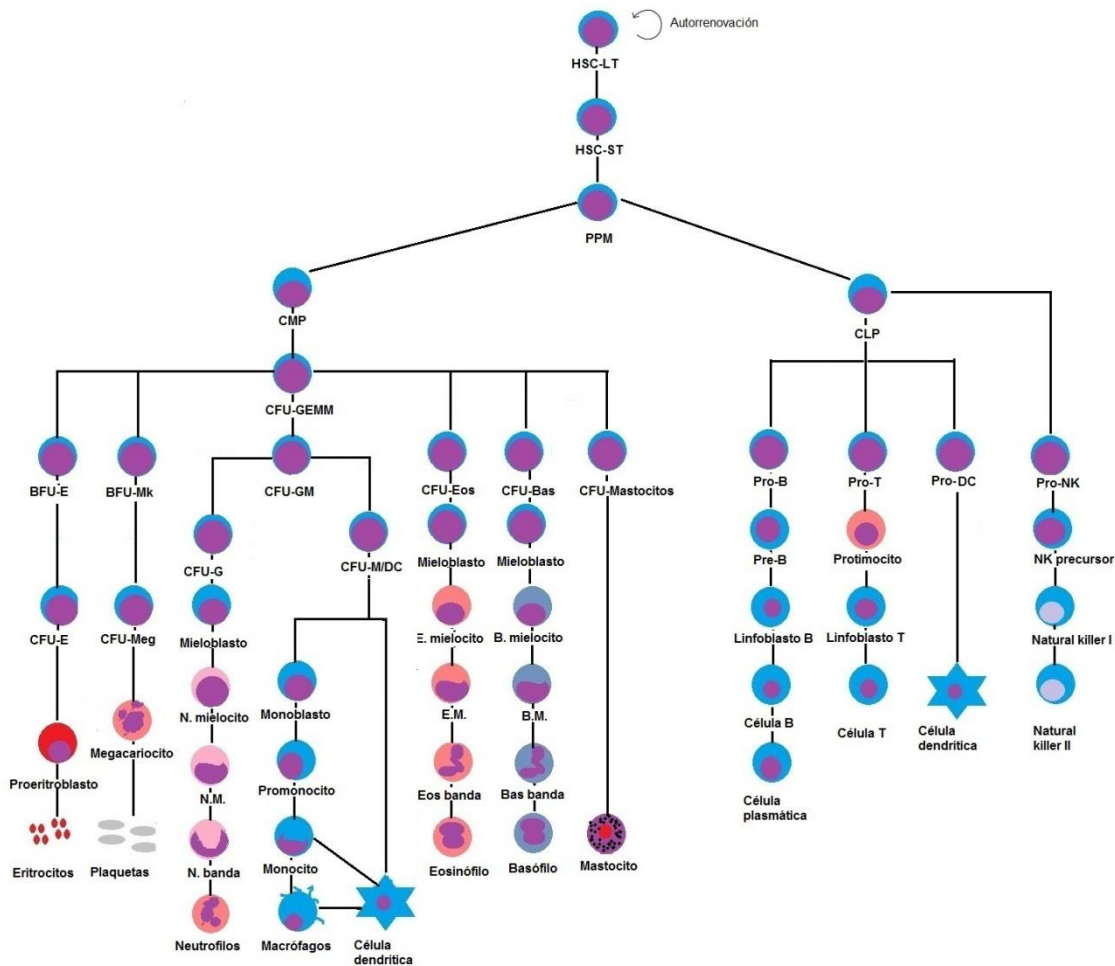


Figura 1. Jerarquía de la hematopoyesis. HSC-LT: células troncal hematopoyética a largo plazo; HSC-ST: células troncal hematopoyética a corto plazo; PPM: progenitor multipotente; CMP: progenitor mieloide común; CFU-GEMM; unidad formadora de colonias de granulocitos-eritrocitos-monocitos-macrófagos; BFU-E: unidad formadora de brotes de eritrocitos; BFU-Mk: unidad formadora de brotes de megacariocitos; CFU-GM: unidad formadora de colonias granulocito-macrófago; CFU-Eos: unidad formadora de colonias de eosinófilos; CFU-Bas: unidad formadora de colonias de basófilos; CFU-mastocitos: unidad formadora de colonias de mastocitos; CFU-G: unidad formadora de colonias de granulocitos; CFU-MDC: unidad formadora de colonias de células dendríticas-macrófagos; CFU-E: unidad formadora de colonias eritroides; CFU-Meg: unidad formadora de colonias de megacariocitos; E. mielocito: eosinófilo mielocito; B. mielocito: Basófilo mielocito; N.M: neutrófilo mielocito; E.M: eosinófilo metamielocito; B.M: Basófilo metamielocito; N. Banda: neutrófilo banda; Eos banda: eosinófilo banda; Bas banda: basófilo banda; CLP: progenitor linfóide común; Pro-B: progenitor de células B; Pro-T: progenitor de células T; Pro-DC: progenitor de células dendríticas; Pro-NK: progenitor de células asesinas naturales. Tomado y modificado de Genzyme

1.2 Microambiente hematopoyético

Las HSC residen en la MO en un ambiente tridimensional altamente organizado compuesto de una población diversa de células del estroma y una matriz extracelular (MEC) rica en fibronectina, colágenos, y diversos proteoglicanos (Kondo *et al.*, 2003; Nervi *et al.*, 2006; Pusic & Dispersio, 2008). No obstante además de sus dimensiones microanatómicas y funcionales del nicho, las funciones fisiológicas de las HSC son controladas por unas combinaciones de mecanismos de regulación tanto intrínsecas como extrínsecas, mediante moléculas que les permiten su completa y constante regulación, la combinación de todos estos factores le dan al nicho hematopoyético su característica principal la cual es mantener un compartimento de HSC en su estado indiferenciado (Can, 2008).

1.2.1 Citocinas

Las decisiones hematopoyéticas y el destino de las HSC están reguladas por señales extrínsecas e intrínsecas, los factores de transcripción que regulan la expresión de genes, junto con señales externas provenientes del microambiente de la MO pueden ser mediadas, ya sea por la interacción célula-célula, matriz extracelular-célula o por factores solubles llamados citocinas (Arai *et al.*, 2009).

Muchas evidencias sugieren que los factores intrínsecos, en última instancia deciden el destino de las HSC, sin embargo, existen otras evidencias que indican el papel de las señales extracelulares de las citocinas y sus receptores. Aunque el papel de las citocinas en la determinación del destino de HSC queda disputado, su importancia en la regulación de la maduración de los progenitores hacia un linaje restringido se establece de manera inequívoca (Buza, 2007).

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular secretadas por diferentes tipos celulares, principalmente macrófagos y células T colaboradoras, se agrupan en factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias (CSF), interferones, interleucinas (IL) y quimiocinas, existen en formas solubles o presentes en la

membrana, actúan de manera autócrina, parácrina o endócrina regulando muchos aspectos de la hematopoyesis tales como las respuestas inmunes, respuestas inflamatorias, la quiescencia, auto-renovación, diferenciación, muerte celular y movilización (Ávalos *et al.*, 2002; Zhang & Lodish, 2008; Sarrazin & Sieweke, 2011). De igual manera no solo existen citocinas que regulan la hematopoyesis de manera positiva, también existen otras con capacidad de inhibirla tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) entre otros (Hamblin, 1993; Jacobsen *et al.*, 1994), pero en condiciones normales existe un balance entre las citocinas reguladoras e inhibidoras lo que da como resultado la producción controlada de células sanguíneas (Ávalos *et al.*, 2002).

Para que las citocinas puedan ejercer sus efectos deben unirse a receptores específicos sobre células blanco, la formación del complejo receptor-ligando trae como consecuencia el desencadenamiento de señales intracelulares a través de la activación de tirosinas cinasas, dando como resultado final la activación celular y una determinada respuesta biológica (Ihle & Kerr, 1995).

Para la mayoría de los linajes hematopoyéticos, se han identificado una gran cantidad de citocinas que ayudan en su regulación, tal es el caso de la trombopoyetina (Tpo) para las plaquetas, eritropoyetina (Epo) para las células eritroides, IL-15 para células asesinas naturales (Nk), IL-7 para células B y T, y el CSF de granulocitos (G-CSF) para los granulocitos, estas citocinas juegan un papel importante en las células progenitoras de linaje comprometido, mientras que para las HSC las citocinas relacionadas incluyen a la IL-6 , 3 , y 11 , el ligando de la tirosina quinasa 3 (FLT3), el factor de células troncales (SCF) y la Tpo las cuales promueven la proliferación y la auto-renovación (Buza, 2007; Zhang & Lodish, 2008).

1.2.3 Nicho hematopoyético

El concepto de nicho hematopoyético como el ambiente especializado para el mantenimiento de las HSC fue propuesto en 1978 por Schofield (Scadden, 2006),

está compuesto por una población especializada de células que juega un papel esencial en la regulación de la auto-renovación, diferenciación, proliferación, migración y muerte por apoptosis de las HSC (Yin & Li, 2006; Forgáčová & Nečas, 2012; Ugarte & Forsberg, 2013). Así mismo, un número de moléculas de adhesión se encuentran relacionadas con mantener ancladas a las HSC a este microambiente tales como el antígeno muy tardío-4 (VLA4) expresado en la mayoría de las HPC; CD44, un glicosaminoglicano hialuronano que participa en la adhesión de las HSC en la MEC y las células del estroma; selectinas P- E- y L-; la molécula de adhesión uPAR (Nervi *et al.*, 2006) así como al receptor CXC-4 (CXCR4), c-kit, Mac-1 (Pusic y Dispersio, 2008), la interacción entre las HSC y su nicho crea el sistema dinámico necesario para su mantenimiento (Scadden, 2006). Estructuralmente este ambiente tridimensional se pueden dividir en 2 componentes, el componente de las células hematopoyéticas y el componente mesenquimal también denominado nicho osteoblástico (Mayani *et al.*, 2007; Forgáčová & Nečas, 2012).

- 1) Componente hematopoyético; compuesto por HSC, HPC de linaje linfóide, mieloide y sus derivados (Can, 2008), a la vez se compone por macrófagos estromales (los segundos componentes del estroma más abundante en la MO). Estas células llevan a cabo diferentes y muy importantes funciones, regulando la hematopoyesis mediante interacciones célula-célula, y por medio de la secreción de citocinas estimuladoras e inhibidoras de la hematopoyesis tal como el CSF de macrófagos (M-CSF), de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y diversas IL, regulan las funciones de los osteoblastos y las células troncales mesenquimales (Mayani *et al.*, 2007; Ugarte & Foserberg, 2013).
- 2) Componente mesenquimal; compuesto de tres diversos tipos de células los cuales van a tener un papel fundamental en la regulación de la hematopoyesis:
 - a) Fibroblastos estromales: son células que expresan una variedad de moléculas de la MEC como vimentina, fibronectina, colágeno tipo I, III y IV, a la vez secretan citocinas como la IL-1, 6, 7, 8, 11, M-CSF, G-CSF, el SCF

y el interferón-beta (IFN- β). Estas moléculas actúan sobre receptores específicos en las células hematopoyéticas, desencadenando cascadas de señalización que modulan la expresión de genes reguladores de proliferación, supervivencia, diferenciación, adhesión y secreción de citocinas (Mayani *et al.*, 2007).

- b) Osteoblastos: son células capaces de regular la hematopoyesis de manera positiva o negativa, así como la producción de citocinas que permiten hacer *homing* a las células hematopoyéticas como la angiopoietina 1 (Ang-1), la Tpo y el factor derivado del estroma (SDF-1). Estudios funcionales indican que la Ang-1 y la Tpo promueven la quiescencia de las HSC, mientras que el SDF-1 regula la migración y localización de las HSC en la MO (Mayani *et al.*, 2007; Kiel & Morrison, 2008; Isawaki & Suda, 2010; Matsumo *et al.*, 2011).
- c) Adipocitos: son una población celular enriquecida en la MO, aun no se entiende cuál es el papel fundamental en la hematopoyesis pero se piensa que pueden desempeñar un papel inhibitorio de ésta, sin embargo la secreción de adiponectina funciona como un regulador positivo de las HSC (Mayani *et al.*, 2007; Naveiras *et al.*, 2009; Matsumo *et al.*, 2011; Ugarte & Forsberg, 2013).

Por otro lado se considera la existencia de otro nicho conocido como el nicho vascular conformado por células endoteliales e identificado en 2002 y por lo cual las moléculas que se encuentran interactuando con las HSC aún no se han comprendido totalmente, sin embargo los primeros estudios revelan que la migración de las HSC dependen en gran parte a una gran cantidad de moléculas de adhesión que se encuentran en este nicho tales como: el SDF-1 y la molécula FGF-4 una molécula que está relacionada con la proliferación y la quiescencia de las HSC (Yin & Li, 2006), el nicho vascular muestra grandes diferencias del osteoblástico, una de las principales diferencias es la cantidad de oxígeno, el nicho vascular es muy rico en oxígeno, bajo este concepto surge la hipótesis de que en un nicho hipóxico tal como el nicho osteoblástico las HSC se mantienen en

G₀ sin embargo cuando necesitan reanudar su ciclo celular se movilizan al nicho vascular para poder proliferar, diferenciarse y recuperar las células hematopoyéticas de los organismos, una vez completada esta misión regresan nuevamente al nicho osteoblástico, de manera que esto es la clave de la regulación de la hematopoyesis bien balanceada (Kopp *et al.*, 2005; Isawaki & Suda, 2010; Johns & Christopher, 2012).

Por otro lado es bien sabido que la compresión de los diferentes nichos ayudan a la compresión de un evento muy particular de las HSC conocido como la movilización, evento que ocurre de manera regular cuando a partir de diferentes circunstancias tales como la necesidad de regenerar el número de células sanguíneas de un organismo, la reducción de la expresión de algunas moléculas de adhesión o inclusive algunas células como los osteoblastos permiten que las HSC que residen en la MO salgan al torrente sanguíneo (Levesque *et al.*, 2010; Mohty & Ho 2011).

1.3 Movilización de células troncales y progenitoras hematopoyéticas

1.3.1 Movilización Fisiológica y Homing

Bajo condiciones normales, las células HSC y las HPC se encuentran en la MO, aunque la liberación de estas células en la circulación, y su migración, supervivencia y re-injerto en la MO son procesos fisiológicos que son parte de su desarrollo. Durante la embriogénesis, las células troncales que forman la sangre migran desde el hígado del feto a través de la circulación, hacia la MO, donde la llenan con un alto número de células sanguíneas inmaduras y a la vez con células comprometidas de todos los linajes. Estas células, a su vez, se liberan en la circulación y llegan a otros sitios del cuerpo (como el bazo y el hígado) mientras se mantiene una pequeña reserva de HSC dentro de la MO, lo que sugiere que hay un movimiento dinámico de las HSC y de la MO a otros sitios del cuerpo. La movilización de las HSC desde la MO está estrechamente regulada por señales especializadas, en las cuales participan citocinas, quimiocinas, factores de

crecimiento y hormonas. Se piensa que el flujo constante de las HSC en adultos puede proporcionar una fuente inmediata de las HPC rápidamente para iniciar la hematopoyesis extramedular en el caso de la pérdida catastrófica de sangre. La migración también puede ser un paso fundamental en el desarrollo de las HSC que se requiere para determinar las decisiones de destino celular (es decir, la diferenciación), debido a esta movilidad se pueden encontrar, en condiciones normales, un bajo número de HSC en circulación (0,01-0,05% de las células en sangre periférica), (Pusic & Dispersio, 2008; Lemoli & D' Addio, 2008; Greenbaum & Link, 2010; Suárez *et al.*, 2012). Por último se sugiere que las HSC contribuyen a la regeneración de los tejidos no hematopoyéticos crónicamente lesionados, bajo condiciones homeostáticas las HSC se mantienen ancladas a la MO por la alta expresión del SDF-1 lo cual las mantienen en un ambiente hipóxico regulando su auto-renovación, proliferación y diferenciación pero al recibir un estímulo enviado por algún tejido dañado migran, pues representar una fuente de células pluripotentes, por lo cual se piensa que podrían ser usadas para la reparación de tejido dañado en circunstancias apropiadas (Kondo *et al.*, 2003; Lemoli & D' Addio, 2008; Suárez *et al.*, 2012).

Por otro lado un requisito previo para la función adecuada de las HSC es la capacidad de viajar a través del torrente sanguíneo y encontrar los nichos especializados en la MO u otros órganos hematopoyéticos como el bazo, en un proceso denominado *homing*.

El *homing* constituye una serie de etapas múltiples que comprenden: El reconocimiento y la interacción con el endotelio microvascular, la transmigración a través del endotelio vascular, y finalmente, la migración y la invasión del tejido blanco, este proceso, similar a la movilización, se basa en una interacción compleja entre las citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, y proteasas que degradan la matriz extracelular (Shirvaikar *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2012). De cierta manera es un proceso muy rápido, tarda de 1-2 horas o no más de dos días, en algunas cuestiones clínicas es importante, tal es el caso del trasplante de HSC, pues es necesario para que el injerto pueda repoblar la MO, sin embargo se puede

recurrir a la retención transitoria en algunos órganos hematopoyéticos como el bazo y el hígado o inclusive en algunos nichos de la MO pero no necesariamente requiere de la división celular, a la vez el *homing* de manera fisiológica ocurre para poder llegar a órganos dañados y ayudar en su reparación (Kondo *et al.*, 2003; Lapidot *et al.*, 2005). Anteriormente se creía que la movilización y el *homing* eran imágenes especulares uno del otro, sin embargo, la evidencia emergente sugiere que no es el caso, aunque ambos procesos implican muchos de los mismos mecanismos y de las interacciones quimiotácticas (Levesque *et al.*, 2010; Shirvaikar *et al.*, 2012).

La extravasación de las HSC/HPC requiere de un conjunto de interacciones moleculares que median el reconocimiento de estas células por el endotelio de la MO, son similares a los que se presentan en los leucocitos cuando viajan a sitios inflamados que están mediados por moléculas de adhesión, para que este proceso pueda darse son necesarias moléculas de adhesión tales como las selectinas E y P y la VCAM-1, sin embargo la señalización de SDF-1/CXCR4 es fundamental en este evento, en algunos trabajos se ha demostrado que la interrupción de esta interacción, conlleva a un *homing* empobrecido o totalmente inhibido (Chotinantakul & Leraanansaksiri, 2012; Sahin & Buitenhuis, 2012; Shirvaikar *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2012).

De manera fisiológica es importante conocer la interacción de las HSC con su microambiente, su regulación y los eventos que necesitan desarrollar para su correcto funcionamiento, sin embargo visto desde puntos de vista para el beneficio humano el conocimiento de este campo ha permitido el desarrollo de estrategias terapéuticas contra gran diversidad de enfermedades, tal es el caso del trasplante de HSC, el amplio conocimiento que se tiene hoy en día en la biología de las HSC, ha permitido el desarrollo de nuevos métodos que a su vez a permitido el mejoramiento del trasplante, por lo cual hoy en día ya no solo es posible la obtención de HSC de MO si no también se pueden obtener de SP a través de la movilización artificial, retroactivamente este proceso igual nos ayuda a comprender más sobre las HSC y su entorno (Bonig & Papayannopoulou, 2012).

1.3.2 Movilización inducida.

A pesar de su relevancia clínica específica, el campo de la movilización de las HSC ha recibido una amplia atención, principalmente ante la creencia de que la movilización podría proporcionar pistas sobre cómo las HSC se conservan en su entorno natural denominado nicho hematopoyético (Bonig & Papayannopoulou, 2013), la primer evidencia de movilización fue en pacientes que había recibido quimioterapia y que mostraron un aumento de HSC en el torrente sanguíneo (Hoggatt & Pelus, 2011), por otro lado la evidencia reciente sugiere que se puede aumentar de manera farmacológica la movilización de células troncales. Una característica notable de la movilización de HSC es la diversidad de agentes movilizadores con diferentes cinéticas y eficiencia que sugieren diversos mecanismos de acción. Un gran número de factores de crecimiento hematopoyéticos, ciertas quimiocinas, y agentes quimioterapéuticos citotóxicos, puede inducir la movilización de HSC. Curiosamente, los factores de crecimiento hematopoyéticos con poblaciones de células blanco distintas y actividades biológicas comparten la capacidad de movilizar HSC y HPC, sin embargo tienen una cinética de movilización retardada, en cambio las quimiocinas movilizan en cuestión de horas después de su administración (Nervi *et al.*, 2006; Pelus, 2008).

Dentro de las citocinas podemos encontrar al G-CSF y al GM-CSF, moléculas aprobadas por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), como agentes movilizadores (Pusic & Dispersio, 2008) y la molécula AMD3100 aprobada en 2009 por esta misma asociación como agente movilizador (Pusic & Dispersio, 2010). Esto se debe a la alteración de la interacción de las HSC con las células del estroma, la remodelación y la regulación de la remodelación de la MO por interacciones osteoclastos/osteoblastos (Lemoli & D'Addio, 2008).

De manera importante la interrupción de las interacciones entre moléculas de adhesión y sus ligandos de citocinas es la base para la movilización de HSC, por esta razón el conocimiento de las HSC con su microambiente y las moléculas de adhesión con las que interactúan para poder mantenerse ancladas a él, ha sido

clave para las estrategias de movilización, por lo cual es importante mencionar que la interacción entre el CXCR4 y el ligando SDF-1 es el más estudiado, varios reportes han mostrado que la degradación y la inactivación dentro de la MO de esta interacción por enzimas proteolíticas tales como la elastasa, catepsina G, y diversas metaloproteinasas son esenciales para la movilización, varios agentes movilizadores rompen este enlace y es así como logran el efecto movilizador deseado, ejemplo de esto es el G-CSF que reduce la expresión de SDF-1, a la vez ayuda a la secreción de proteasas que rompen este enlace y provocan la movilización y en el caso del AMD3100 es el antagonista de CXCR4 lo cual es el factor de su rápida movilización (Petit *et al.*, 2002; Nervi *et al.*, 2006; Cashen *et al.*, 2007; Motabi & DiPersio, 2012; Bonig & Papayannopoulou, 2013).

El objetivo de la movilización es obtener al menos 2×10^6 células $CD34^+$ /Kg. Sin embargo existen factores que reducen la movilización, que incluyen la edad, radioterapia previa, ciertas enfermedades, sexo, etc., por lo cual el número de células movilizadas no es suficiente (Pelus, 2008), además el 25% de los pacientes con enfermedades como linfomas o leucemias y en un 10-20% en individuos sanos no responden a los agentes movilizadores (Pelus, 2008; Mohty & Ho, 2011; Shirvaikar *et al.*, 2012), a este evento se le conoce movilización escasa y a los movilizadores se les denota como movilizadores poco favorables (Mohty & Ho, 2011; Lemoli, 2012).

En 1990 el protocolo comúnmente usado para inducir la movilización era el G-CSF solo o en compañía de agentes quimioterapéuticos tales como la ciclofosfamida o la doxorubicina, entre otras varias, y mostraba resultados magníficos (To *et al.*, 2011), al igual que el G-CSF muchas otras citocinas tales como el GM-CSF, IL-3, 7, 12, SCF, el ligando Flt-3 y quimiciocinas como la IL-8 son capaces de inducir la movilización de HSC a SP clínica o experimentalmente (Greinex & Woral, 2009), sin embargo hasta antes de 2009 solo el G-CSF y el GM-CSF eran los únicos aprobados por la FDA, posteriormente se aprobó el uso del AMD3100 en los pacientes cuyo primer régimen de movilización con G-CSF fallaba, Flomenberg *et al.*, en 2005 demostró que esta combinación aumentaba considerablemente el número de HSC, en comparación al G-CSF por sí solo. Hoy en día es la

combinación más utilizada clínicamente por su gran capacidad de movilización (Greinex & Woral, 2009; Lemoli, 2012; Bakanay & Demirer, 2012), sin embargo con la finalidad de alcanzar un 100 % en los casos de movilización, hoy se investigan una gran gama de agentes movilizadores incluyendo su cinética y efectividad de movilización, algunos de estos agentes se muestran en el siguiente cuadro:

Tabla 1. Agentes movilizadores utilizados clínica o experimentalmente

Agente	Mecanismo básico	# de células movilizadas	Referencia
G-SCF	Reduce la expresión de quimiocina SDF-1	$>2.0 \times 10^6$ CD34 ⁺ cells/kg	Henon <i>et al.</i> , 1992; Schmitz <i>et al.</i> , 1996
AMD3100	inhibe la unión de SDF-1 a su receptor CXCR4	$>5.0 \times 10^6$ CD34 ⁺ cells/kg	Hendrix <i>et al.</i> , 2000
Péptido CXCR4	Agonista del receptor CXCR4	No mostrado	Fukuda <i>et al.</i> , 2005
Factor de células troncales (SCF)	Ligando natural del receptor c-kit Funciona en conjunto con otros movilizadores	$>2.0 \times 10^6$ CD34 ⁺ cells/kg	Morstyn <i>et al.</i> , 1994
Proteína de crecimiento reguladora beta (Gro-β)	Tiene unión específica al receptor CXCR2	No mostrado	King <i>et al.</i> , 2001
Interleucina 8 (IL-8)	Interviene con la molécula MMP9 de la matriz extracelular	No mostrado	Laterveer <i>et al.</i> , 1995
La hormona de crecimiento recombinante humana (rhGH)	Permite la proliferación de los diferentes linajes sanguíneos	$>5.0 \times 10^6$ CD34 ⁺ cells/kg	Carlo <i>et al.</i> , 2004
La hormona paratiroidea recombinante humana (rhPTH)	Relacionado con el ligando Nocht y el incremento de número de HSC	No mostrado	Calvi <i>et al.</i> , 2003
Trombopoyetina (Tpo)	Regula la megacariocitosis e induce la movilización	Aumenta al doble la población de CD34 ⁺	Vadhan-Raj <i>et al.</i> , 1997

Las HSC movilizadas tienen como finalidad ser utilizadas para el trasplante autólogo o alogénico en pacientes que han sufrido un régimen mieloablativo por lo cual la investigación de muchos otros agentes solos o en combinación con G-CSF se han utilizado para tratar de mejorar la movilización, no sólo para aumentar el rendimiento de células troncales, sino también con el objetivo de mejorar la calidad del contenido del injerto y los resultados del trasplante (Pelus, 2008; Bakanay y Demirer, 2012).

1.4 El trasplante de HSC movilizadas

El trasplante de células troncales y progenitoras hematopoyéticas en algunas enfermedades como la leucemia puede ser la mejor alternativa pues se ha comprobado que puede curar hasta el 50% de los pacientes trasplantados (Gómez *et al.*, 2012), es el método para reconstituir la MO normal en pacientes que recibieron un régimen de quimioterapia o radioterapia para el tratamiento contra varios tipos de cáncer, enfermedades hematológicas, metabólicas entre otras. Aproximadamente 60,000 trasplantes autólogos y alogénicos son realizados anualmente (Shirvaikar *et al.*, 2012).

En principio la fuente de HSC para trasplante fue la MO, sin embargo debido a inconvenientes como prolongadas citopenias (en especial neutropenia), tiempo de hospitalización prolongado y alta mortalidad; surgió la necesidad de buscar otras fuentes de células para reconstitución hematopoyética (Oliveros *et al.*, 2003), entre ellas la sangre periférica (SP), la cual si bien fue introducida en la clínica en 1986, en la actualidad ha sustituido a la MO como fuente de HSC, así todos los trasplantes autólogos y el 75% de los alogénicos usan como fuente la SP (Körbling & Freireich, 2011). De hecho se ha reportado que el uso de las HSC obtenidas de la sangre, en comparación de las de MO, incluyen un período más corto de la neutropenia, que se traduce en la reducción del uso de antibióticos, disminución del riesgo de infección, hospitalización más corta, y la reducción de costos (Devine *et al.*, 2010) también se pueden recolectar de manera más fácil y un mayor número de HSC de la SP que de la MO (American Cancer Society, 2012).

El primer trasplante exitoso de MO se llevó a cabo en 1968, posteriormente fueron reportados éxitos similares y para 1986, más de 200 centros de trasplantes en todo el mundo realizaban 5,000 procedimientos anualmente, sin embargo a la vez hubo factores que impedían los avances en el trasplante de MO; uno de los más importantes fue el complejo mayor de histocompatibilidad, provocando que los primeros trasplantes fueran poco exitosos. En 1970 la mayoría de los trasplantes de HSC se realizaba con un donador relacionado pero solo un 30% de los pacientes tenían un donador compatible (Bishop, 2009; Rivera, 2011).

El descubrimiento en 1980 de las HSC movilizadas a SP con capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético de sujetos mielosuprimidos fue un impresionante paso en la clínica, a partir de ese momento varias instituciones se dieron a la tarea de demostrar que estas podían servir como una alternativa del trasplante de HSC de MO (Mohty & Ho, 2011; Motabi & DiPersio, 2012). Hoy en día se reportan mayores tasas de supervivencia en los pacientes que reciben un trasplante, sin embargo estos muestran un deterioro en su calidad de vida antes, durante y después del trasplante, debido a varios factores como la radiación, la quimioterapia, la enfermedad injerto contra huésped (GVHD), las infecciones, la inactividad a largo plazo o el reposo en cama y los efectos secundarios de los medicamentos pueden contribuir al debilitamiento físico y emocional del paciente (Jarden, 2009), los reportes clínicos más recientes revelan que las tasas de sobrevida libre de enfermedad a largo plazo son mayores en SP, por ejemplo las estadísticas indican que enfermedades como las leucemias agudas el trasplante de MO obtienen sobrevidas del 50% mientras el trasplante de SP logra tasas de supervivencia del 60%, en linfomas y mieloma múltiple el porcentaje es de 40% vs 50%, mientras que en leucemias mieloides crónicas el porcentaje de supervivencia es del 65% para MO mientras que para SP la supervivencia es del 81% (Cheuk, 2013), es importante tomar en cuenta la diferentes complicaciones que se pueden presentar antes, durante y después del trasplante, primero que nada los regímenes mieloablativos de condicionamiento en función de las altas dosis de radioterapia y quimioterapia inducen una toxicidad intensa y tienen una tasa de mortalidad alta, por lo tanto, estos regímenes han sido modificados con el objetivo

de reducir la toxicidad, manteniendo o mejorando la eficacia del trasplante (Oyala y Pérez, 2011; Shi *et al.*, 2013), por otro lado el trasplante de SP muestra grandes ventajas sobre el trasplante de MO pero a la vez muestra desventajas tal es caso de la obtención de HSC/HPC que deben ser movilizadas a SP en algunos casos esta movilización llega a fallar por lo cual no se obtienen las cantidades de células necesarias para el trasplante y se necesita repetir la recolección de las células en repetidas ocasiones, en algunos casos existe un ligero riesgo de contaminación del injerto con alguna célula cancerígena cuando el trasplante es autólogo, las infecciones, GVHD y el mal *homing*, son riesgos que se corren durante este proceso (Lapidot *et al.*, 2005; Mohty & Ho, 2011; Lemoli, 2012). Ante los datos reportados la investigación está en curso para identificar nuevos agentes o combinaciones que conduzcan a las estrategias de movilización a ser más eficaces, sobre todo en aquellos pacientes que están en riesgo de que fracase la movilización así como mejorar la calidad del injerto y los resultados de supervivencia después del trasplante (Bakanay & Demirer, 2012; Hopman & DiPersio, 2014).

1.5 Caseínas y movilización de HSC/HPC

La leche contiene una gran cantidad de proteínas, dentro de las cuales la caseína es la principal (75-80%) (Meisel, 1997). La caseína se encuentra constituida por micelas las cuales están conformadas por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas α -s₁, α -s₂, β y κ -caseína. La caseína es poco soluble en agua, pero puede ser diluida a un pH 6.6 produciendo derivados, altamente solubles en agua, conocidos como caseinatos. El caseinato de sodio (CasNa) es una sal de las caseínas, éste se obtiene disolviendo caseína en hidróxido de sodio, el resultado es un polvo blanco sin sabor, ni olor, soluble en agua y que además contiene un 65% de proteínas (Walstra & Jenneis, 1984). Se ha demostrado que la inyección intraperitoneal induce la acumulación de granulocitos y macrófagos en la cavidad peritoneal de ratones (Passoti *et al.*, 1993). Interesantemente se sabe que el efecto biológico del CasNa aumenta el número de células mononucleadas (CMN) en MO (Martínez, 2006; Silvestre, 2007; Domínguez *et al.*, 2012) y un aumento en el tamaño, peso y celularidad del bazo (Lagunes, 2004; Domínguez, 2007; Silvestre, 2011) parámetros que sugieren activación de la hematopoyesis extramedular lo cual puede involucrar migración de HSC o HPC (O'Malley *et al.*, 2005). Recientemente se demostró que induce la movilización de células troncales/progenitoras hematopoyéticas mediante el inmunofenotipo, para HSC/HPC, KSL (Silvestre, 2011), la activación de la granulopoyesis y el aumento en el suero del G-CSF y el GM-CSF (Lotem & Sachs, 1985; Metcalf *et al.*, 1996; Domínguez *et al.*, 2012), citocinas empleadas en la movilización de HSC y HPC (Pusic y Dispersio, 2008), por lo que existe la posibilidad de que el CasNa pueda ser un agente movilizador de células troncales de MO.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la inoculación de CasNa aumenta el número de CMN en MO así como el tamaño, peso y celularidad del bazo, se ha mostrado que aumenta la concentración en el suero del G-CSF y el GM-CSF que induce la movilización de células progenitoras hematopoyéticas mediante el inmunofenotipo, para HSC/HPC, KSL, sin embargo se desconoce si estas células movilizadas contienen células troncales hematopoyéticas.

3. JUSTIFICACIÓN

La movilización de células troncales hematopoyéticas a SP es inducida por un gran número de citocinas, quimiocinas y algunos quimioterapéuticos, sin embargo los agentes movilizadores poseen ventajas y desventajas. El objetivo de la movilización es obtener al menos 2×10^6 de células $CD34^+$ /kg de peso del receptor, pero existen factores que reducen la movilización, como la edad, radioterapia, ciertas enfermedades y sexo, entre otros (Pelus, 2008), por la misma razón se necesitan estrategias novedosas para aumentar el rendimiento de células troncales y también con el objetivo de mejorar la calidad del contenido del injerto y los resultados del trasplante (Bakanay & Demirer, 2012).

Si se logra demostrar que el CasNa tiene efecto de movilizador de células troncales hematopoyéticas, podría ser utilizado como una nueva alternativa terapéutica para la movilización y el trasplante de células troncales, ya sea solo o en combinación de otro agente movilizador.

4. HIPÓTESIS

Si la inoculación de CasNa en ratones induce la movilización de células troncales así como de progenitoras hematopoyéticas a sangre periférica, entonces se espera que ratones irradiados letalmente, trasplantados con células movilizadas con CasNa reconstituyan su sistema hematopoyético y por lo tanto sobrevivan.

5. OBJETIVOS

General:

- Evaluar si el CasNa induce la movilización de células troncales así como progenitoras hematopoyéticas a sangre periférica.

Particulares:

- Comparar el efecto movilizador de células progenitoras a sangre periférica entre CasNa, AMD3100 y CasNa + AMD3100 mediante unidades formadoras de colonias (CFU).
- Determinar la dosis supraletal de radiación para ratones Balb/c.
- Trasplantar células progenitoras movilizadas a sangre periférica a ratones irradiados letalmente.
- Comparar la supervivencia de ratones irradiados letalmente y trasplantados con CMN obtenidas de sangre periférica de ratones tratados con vehículo, CasNa, AMD3100 o CasNa + AMD3100.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Animales

Los procedimientos que involucraron animales fueron llevados a cabo bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ratones sinérgicos hembra y/o machos de la cepa Balb/c, en condiciones libres de patógenos obtenidos del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de 2-3 meses de edad fueron mantenidos con alimento y agua en condiciones *ad libitum*.

6.2 Tratamiento de los ratones y aislamiento de las células mononucleadas

Los ratones utilizados en este trabajo fueron divididos en 4 grupos, un grupo recibió 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS como vehículo), otro grupo 1 mL de caseinato de sodio (CasNa) (Spectrum, New Brunswick, NJ) (0.1 g/ml en PBS), el siguiente 1 mL de AMD3100 (5 mg/kg de peso del ratón en PBS) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) y el último grupo recibió 1 mL CasNa (0.1 g/ml en PBS) más AMD3100 (5 mg/kg de peso del ratón en PBS) (DUO). Los grupos de vehículo, CasNa y DUO fueron inoculados vía intraperitoneal, cada 48 h durante 6 días con 1 ml de tratamiento mientras el grupo de AMD3100 y DUO recibieron una sola inoculación una hora antes del sacrificio y 24 h después de la última inyección de PBS o CasNa, los animales fueron anestesiados con éter, se obtuvo la sangre del plexo axilar y cuando murieron se obtuvieron fémures y bazos, posteriormente se aislaron las CMN de SP o MO mediante un método de gradiente de densidad empleando ficoll ($\delta=1.077$ g/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). Una vez obtenidas estas CMN se evaluó el número celular realizando un conteo en el hemocitómetro bajo el microscopio a 10x.

6.3 Determinación del índice esplénico

Antes del sacrificio los ratones fueron pesados y el valor fue registrado. Después de extraer el bazo fue pesado y se calculó el índice esplénico como el cociente del peso del bazo entre el peso del ratón.

6.4 Ensayo de unidades formadoras de colonias

Para verificar la funcionalidad de las CMN que serían utilizadas para el trasplante, se realizó un ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU). Brevemente, las CMN aisladas de SP de los ratones inoculados como se describió anteriormente, fueron cultivadas en cajas petri de 35 mm x 10 mm (Corning, NY, USA), a una densidad de 1×10^5 CMN/mL para SP en un medio semisólido de metilcelulosa (Methocult; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) el cual contiene un cóctel de factores de crecimiento, tales como: el factor de células troncales recombinante de ratón (rmSCF), IL-3 recombinante de ratón (rmIL-3), IL-6 recombinante humana (rhIL-6) y eritropoyetina recombinante humana (rhEpo). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C, 5 % de CO₂ y humedad a punto de rocío durante 14 días y posteriormente se contaron el número de colonias y se observó morfología de las colonias en un microscopio invertido a 10x. El criterio considerado para determinar el linaje de cada colonia fue de acuerdo a lo descrito en el manual “ensayos para células formadoras de colonias de ratón usando methocult” (Methocult; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá).

6.5 Estandarización de la dosis de radiación supraletal

Para establecer el modelo de mielosupresión en ratones BALB/c se siguieron las recomendaciones de The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) (Duran & Dysco, 2009). Tomando en cuenta estas recomendaciones, en este trabajo se utilizaron ratones hembra Balb/c y se mantuvieron en las condiciones antes descritas, una semana antes de recibir la radiación, fueron condicionados

con agua acidificada a pH 3, y se mantuvieron en estas condiciones hasta su muerte como lo establece la IACUC.

De acuerdo a lo descrito anteriormente en la literatura para la estandarización de radiación bajo nuestras condiciones de trabajo se tomaron en cuenta dos diferentes dosis de radiación, por lo cual un total de 15 ratones fueron sometidos a una dosis de radiación supraletal de rayos gamma de 9.5 Gy (de Kruijf *et al.*, 2010) y 15 recibieron 8.5 Gy (Fibbe *et al.*, 1992; Laterveer *et al.*, 1995; Zijlmans *et al.*, 1995, 1998), los ratones fueron irradiados con un irradiador Gammacell-1000 Nordion isótopo ^{137}Cs .

En seguida, los ratones fueron mantenidos en microaisladores bajo condiciones estériles siendo observados hasta la muerte (una semana).

Con el objetivo de determinar la dosis de radiación óptima se observaron síntomas entre cada grupo como pérdida de peso, piloerección, pérdida de movilidad, postración estado de alerta. Finalmente se registró el tiempo de muerte, y daño en algunos órganos tales como el bazo y el intestino.

6.6 Radiación y trasplante

Una vez determinada la dosis de radiación gamma que era supraletal sobre ratones Balb/c, se procedió a condicionar a otros grupos de ratones con 8.5 Gy de irradiación para después ser trasplantados o no con CMN, los grupos fueron divididos de la siguiente manera:

- ✓ Sin trasplante
- ✓ Trasplantados con CMN obtenidas de SP de ratones tratados con PBS
- ✓ Trasplantados con CMN obtenidas de SP de ratones tratados con CasNa
- ✓ Trasplantados con CMN obtenidas de SP de ratones tratados con AMD3100
- ✓ Trasplantados con CMN obtenidas de SP de ratones tratados con DUO
- ✓ Trasplantados con CMN obtenidas de MO de ratones tratados con PBS
- ✓ Trasplantados con CMN obtenidas de MO de ratones tratados con CasNa

Adicionalmente se consideró un grupo control de ratones sin radiación y sin trasplante.

De 3 a 4 horas después de recibir la radiación, cada receptor fue trasplantado por vía caudal (200 μ L de PBS con suero de ratón al 1%) con 2×10^6 CMN obtenidas de SP o MO y se mantuvieron en microaisladores con alimento y agua ácida a pH 3 estériles *ad libitum* siguiendo su progreso diariamente.

6.7 Criterios de efectividad de trasplante

La recuperación de los ratones después de la radiación, fue evaluada mediante la ganancia de peso, así como supervivencia a corto plazo (2-3 meses) y a largo plazo (6 meses).

6.8 Manejo de datos

A menos que se indique lo contrario, se realizaron al menos tres experimentos por separado. Los datos se presentan como la media $\pm$ la desviación estándar. Para determinar diferencias significativas entre los datos se empleó una prueba de Tukey ($p < 0.05$) y para la supervivencia fue reportada con graficas de Kaplan-Meier usando el paquete estadístico SPSS 18.0.

7. RESULTADOS

7.1 La inoculación de CasNa aumenta el número de células mononucleadas en sangre periférica de ratones sanos

Para confirmar que CasNa aumenta el número de CMN en sangre periférica (SP) ratones Balb/c fueron tratados con 1 mL de vehículo (PBS), CasNa (0,1 g/mL), AMD3100 (5 mg/kg) o DUO (CasNa + AMD3100).

Las CMN se obtuvieron mediante un gradiente de densidad por ficoll y el número de células fue evaluado por conteo celular. Los resultados mostraron que el número de CMN obtenidas de SP de ratones tratados con CasNa, AMD3100 y DUO aumentaron significativamente en comparación al número de CMN obtenidas de SP vehículo, a su vez al analizar el efecto conjunto de CasNa + AMD3100 no mostró un aumento en comparación a los tratamientos individuales (Figura 2).

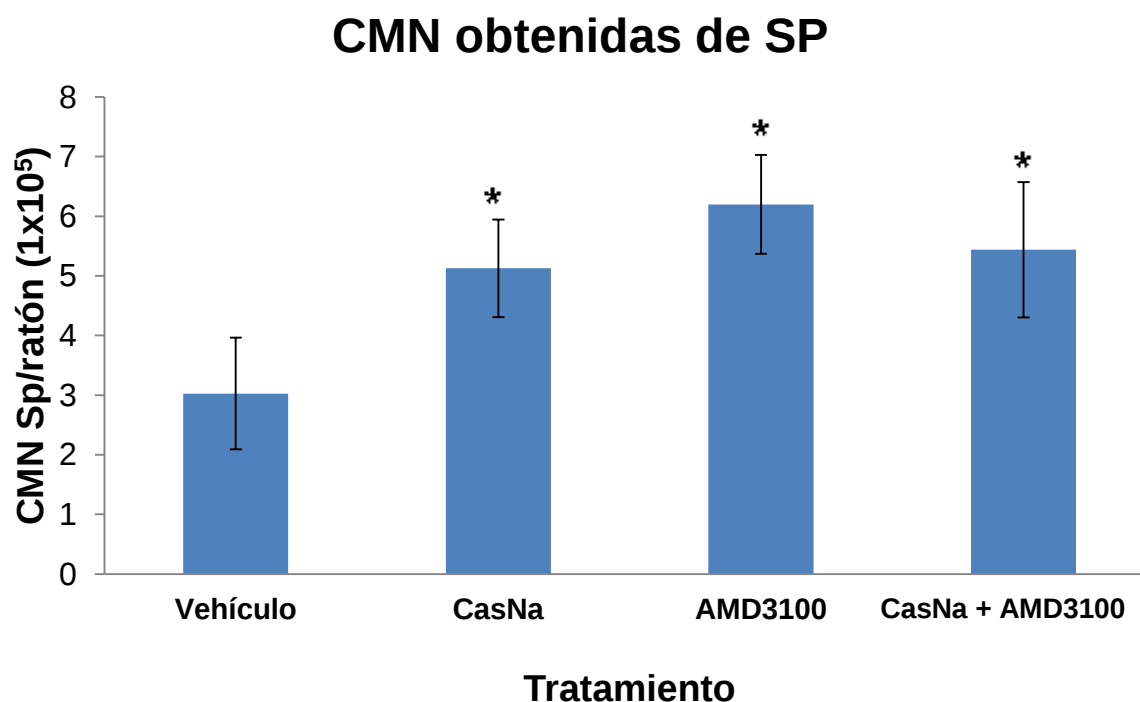


Figura 2. CasNa aumenta el número de CMN en sangre periférica de ratones. Número de CMN obtenidas de SP de ratones inoculados con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (vehículo), 1 mL de caseinato de sodio (CasNa) (0.1 g/mL), 1 mL de AMD3100 (5 mg/kg) o DUO (CasNa + AMD3100) (0.1 g/mL + 5 mg/kg) n=10/grupo. *Diferencia significativa con respecto al vehículo p<0.05. Prueba de Tukey.

7.2 La inoculación de CasNa aumenta el tamaño del bazo en ratones sanos

Una vez sacrificados los ratones donadores de CMN, se obtuvo el bazo y se observó incremento en el tamaño de este órgano en los ratones tratados con CasNa y DUO en comparación a los bazos de ratones que fueron inoculados con vehículo o AMD3100 (Figura 3).

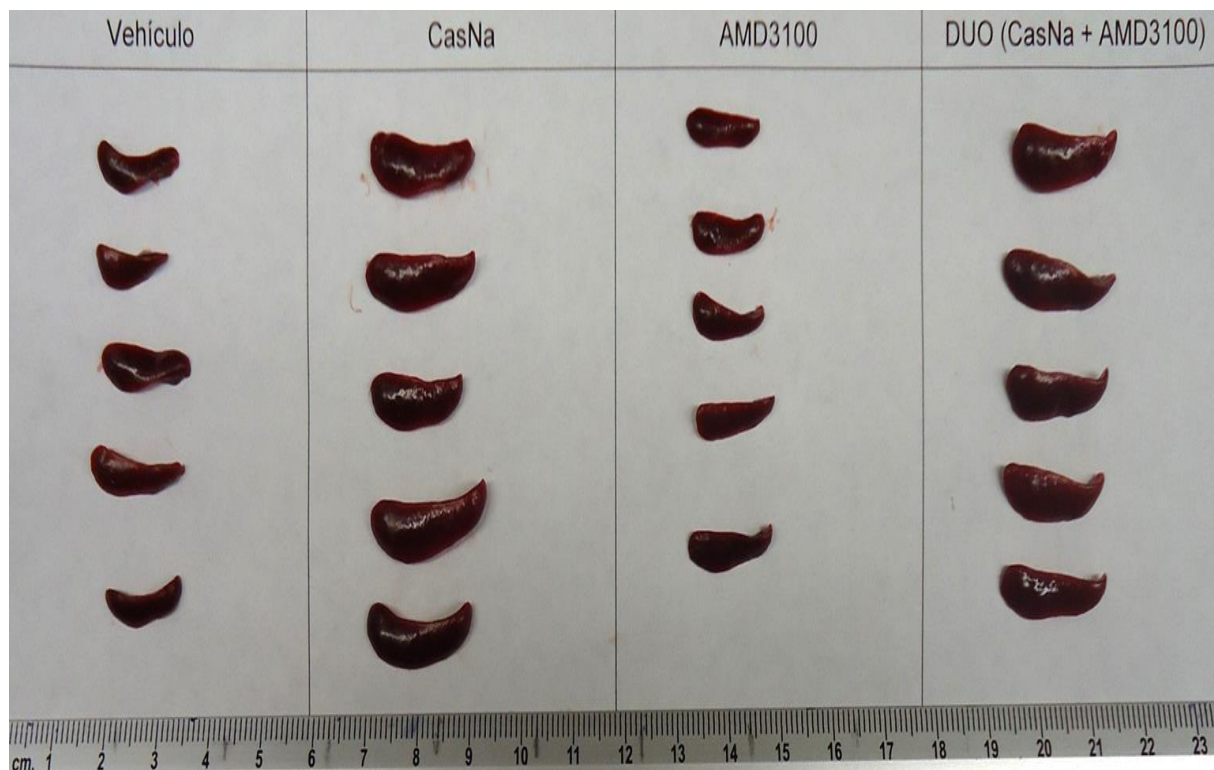


Figura 3. CasNa aumenta el tamaño de los bazos en ratones. Imagen representativa de los bazos obtenidos de ratones inoculados con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (vehículo), 1 mL de caseinato de sodio (CasNa) (0.1 g/mL), 1 mL de AMD3100 (5 mg/kg) o DUO (CasNa + AMD3100) (0.1 g/mL + 5 mg/kg) n=10/grupo.

Al realizar el índice esplénico como el cociente del peso corporal entre el peso del órgano, se comprueba un aumento significativo en los tratamientos de CasNa y DUO comparado con el vehículo y el AMD3100, (Figura 4).

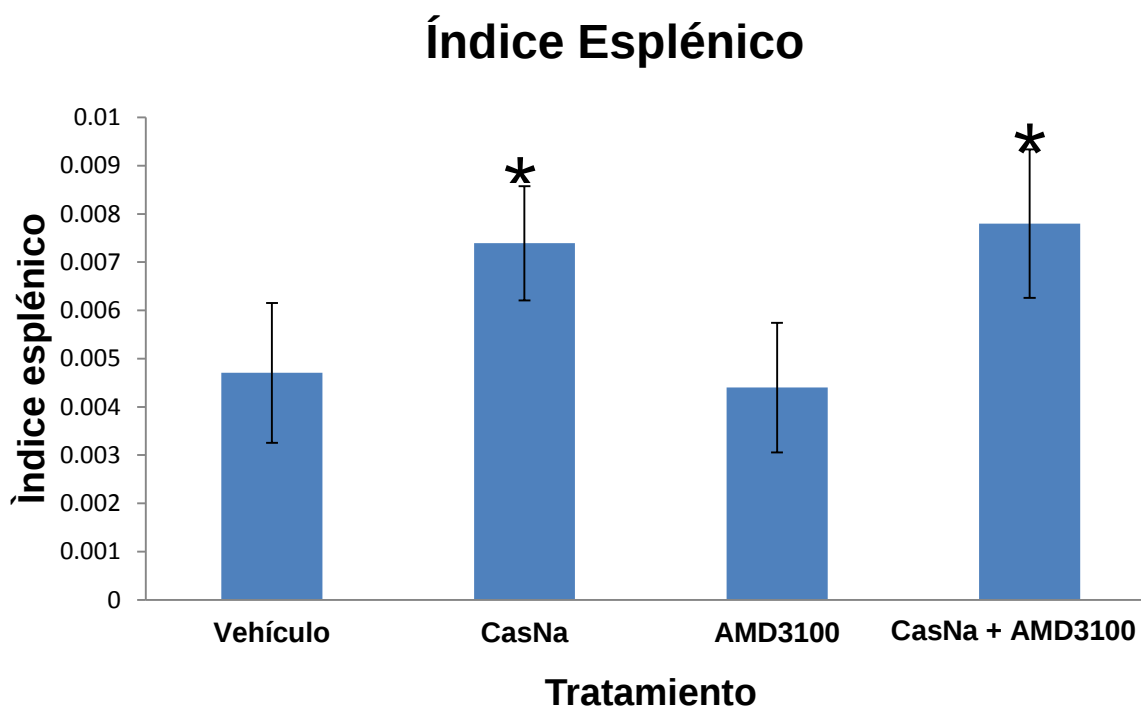


Figura 4. CasNa aumenta el índice esplénico en ratones. Índice esplénico de ratones inoculados con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (vehículo), 1 mL de caseinato de sodio (CasNa) (0.1 g/mL), 1 mL de AMD3100 (5 mg/kg) o DUO (CasNa + AMD3100) (0.1 g/mL + 5 mg/kg) n=10/grupo. *Diferencia significativa con respecto al vehículo $p<0.05$. Prueba de Tukey

7.3 La inoculación de CasNa aumenta el número de células progenitoras en sangre periférica

Debido a que el tratamiento con CasNa incrementa el número de CMN en SP, se evaluó el número de células progenitoras y el potencial para formar colonias de estas CMN (Figura 5).

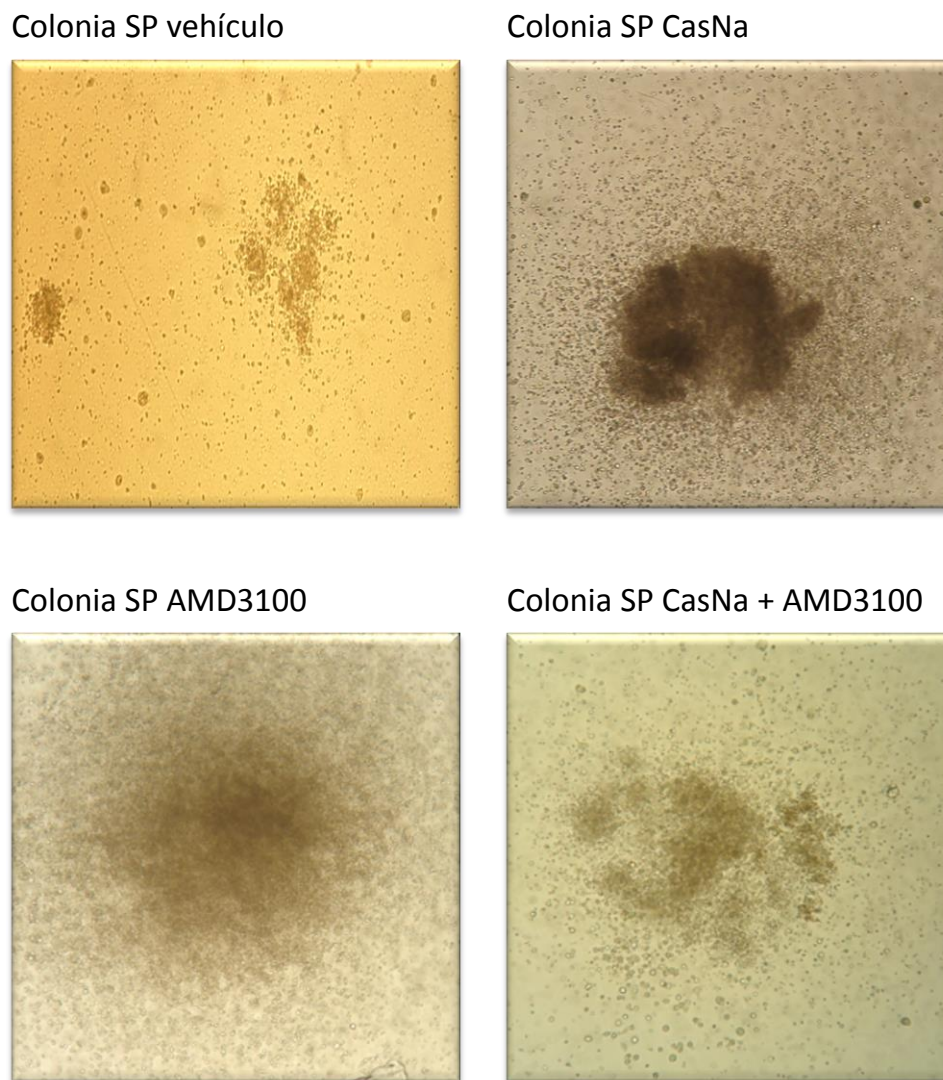


Figura 6. CasNa tiene el potencial de formar colonias. Imagen representativa de colonias formadas a partir de CMN de SP de ratones inoculados con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (vehículo), 1 mL de caseinato de sodio (CasNa) (0.1 g/mL), 1 mL de AMD3100 (5 mg/kg) o DUO (CasNa + AMD3100, 0.1 g/mL + 5 mg/kg).

Se observó que el número de colonias totales formadas provenientes de CMN de SP de CasNa, AMD3100 y DUO aumentan hasta 15 veces el número de células progenitoras en SP en comparación al vehículo (Figura 6).

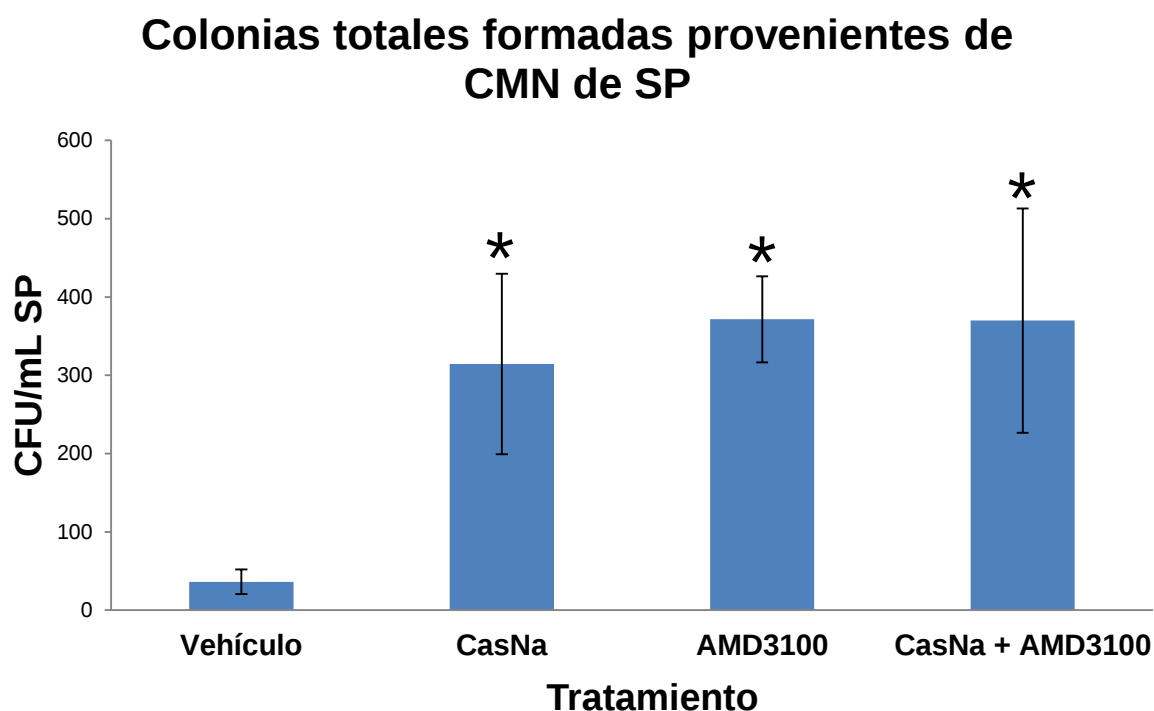


Figura 6. CasNa aumenta el número de progenitores en sangre periférica. Número de colonias formadas (CFU) por mL obtenidas de CMN de SP de ratones inoculados con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (vehículo), 1 mL de caseinato de sodio (CasNa) (0.1 g/mL), 1 mL de AMD3100 (5 mg/kg) o DUO (CasNa + AMD3100, 0.1 g/mL + 5 mg/kg). *Diferencia significativa con respecto al vehículo $p < 0.05$. Prueba de Tukey

Al analizar el linaje celular de las colonias formadas las células movilizadas con AMD3100 presentaron un mayor número en colonias de linaje de granulocitos, muy pocos en el linaje de macrófagos y colonias de granulocitos-macrófagos, en cuanto CasNa y DUO presentaron un aumento mayor en los tres linajes, principalmente en granulocitos seguido de colonias de linaje granulocitos-macrófagos, en ningún tratamiento se encontraron colonias de linaje eritroide (Figura 7).

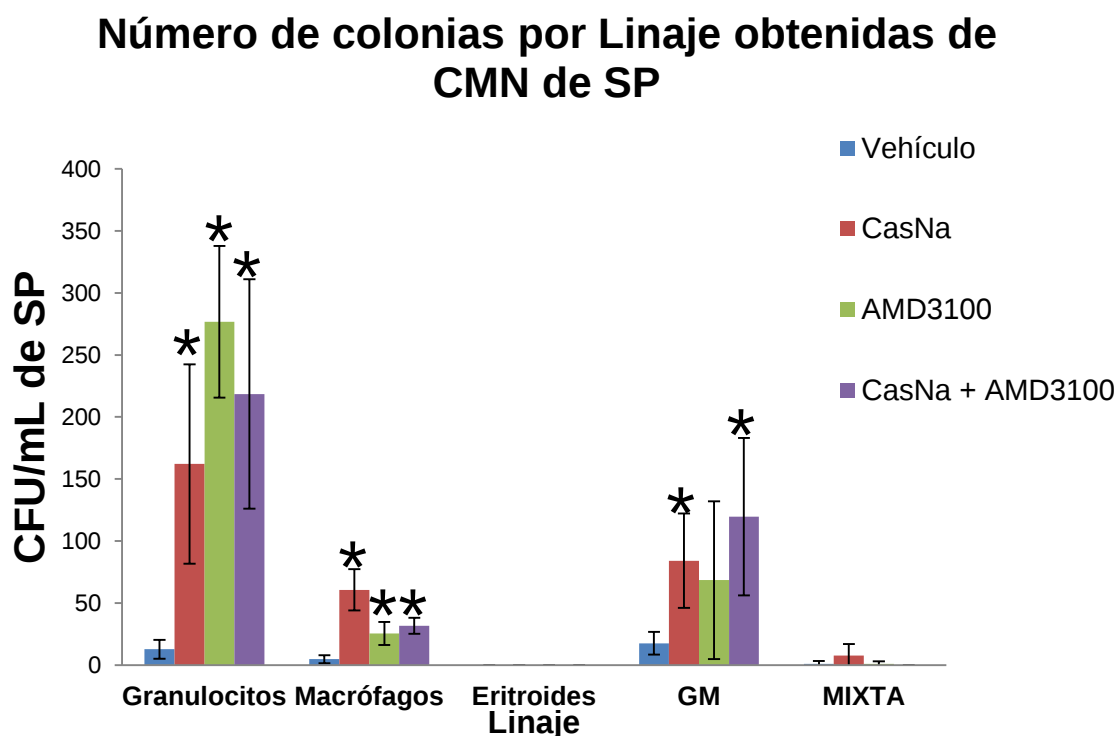


Figura 7. CasNa aumenta el número de progenitores de diferentes linajes hematopoyéticos en sangre periférica. Linaje y número de colonias formadas (CFU) obtenidas de CMN de SP por mL de ratones inoculados 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (vehículo), 1 mL de caseinato de sodio (CasNa) (0.1 g/mL), 1 mL de AMD3100 (5 mg/kg) o DUO (CasNa + AMD3100, 0.1 g/mL + 5 mg/kg) *Diferencia significativa con respecto al vehículo $p < 0.05$. Prueba de Tukey

7.4 La exposición de ratones a la radiación de 8.5 o 9.5 Grays induce mieloablación

Una vez observado que CasNa tenía la capacidad de aumentar el número de CMN en SP, las cuales tenían la capacidad para formar colonias en metilcelulosa, se decidió comprobar la funcionalidad de estas células que hasta ese momento mostraban tener características de ser HSC/HPC, por lo cual se procedió a realizar un trasplante de estas células en ratones mielosuprimidos, por lo cual se estableció un modelo de mieloablación por radiación en ratones Balb/c empleando dos diferentes dosis de radiación Gamma las cuales fueron de 8.5 y 9.5 Grays (Gy), los datos mostraron que ambas inducen la muerte de los ratones sin embargo la dosis de 8.5 Gy permitía la supervivencia de un 10% de los individuos hasta 9 días, cuando la dosis de 9.5 Gy solo lo permitía por 6 días (Figura 8).

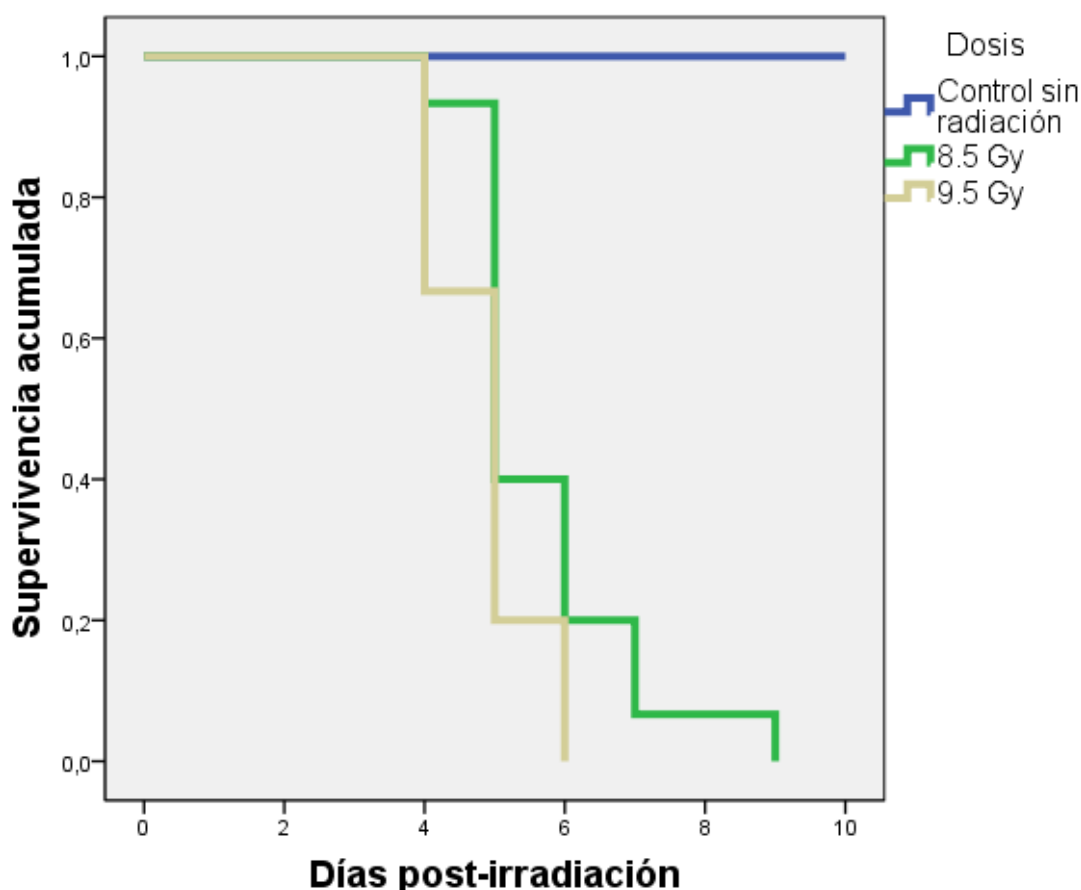


Figura 8. La exposición de ratones a la radiación gamma induce su muerte. Tiempo de mortalidad de ratones Balb/c sometidos a una dosis de radiación de 8.5 o 9.5 Gy, n=15/grupo. Kaplan-Meier

De manera adicional se evaluó la presencia de signos físicos post-irradiación tales como la piloerección, estado flemático, dificultad respiratoria, postración, estado de alerta, movilidad. Se observó que el estado general del ratón empieza a cambiar en el tercer día post-radiación y los cambios físicos que se presentan se agravan en el cuarto y quinto día y hasta su muerte (Tabla 2), sumado a esto la cavidad peritoneal de ratones fallecidos, muestran evidencias de que la dosis de 8.5 Gy inducía menor daño en el intestino, hígado y bazo respecto a la dosis de 9.5 Gy que provocaba una necrosis severa (Figura 9), durante este mismo tiempo se evaluó el porcentaje de pérdida de peso, de manera interesante en ratones expuestos a 8.5 Gy la pérdida es menor del 20% comparado con la dosis de 9.5 Gy que tuvo una pérdida mayor del 30% (Figura 10, tabla 3). Considerando todos estos resultados se decidió que la dosis que se emplearía como régimen mieloablativo sería de 8.5 Gy.

Tabla 2. La exposición de ratones a la radiación gamma induce signos físicos notables

Signos/tiempo	Día uno			Día dos			Día tres			Día cuatro			Día cinco		
Dosis	C	8.5	9.5	C	8.5	9.5	C	8.5	9.5	C	8.5	9.5	C	8.5	9.5
Piloerección	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	0	3	3
Estado flemático	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	0	3	3
Dificultad respiratoria	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	0	3	3
Postración	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	0	3	3
Problemas de marcha	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	0	3	3

Efecto de la radiación en el estado físico de ratones sometidos a una dosis de 8.5 o 9.5 Gy. 0= No se presenta signo físico, 1= El signo se presenta muy poco, 2= el signo es notorio, 3= el signo es grave

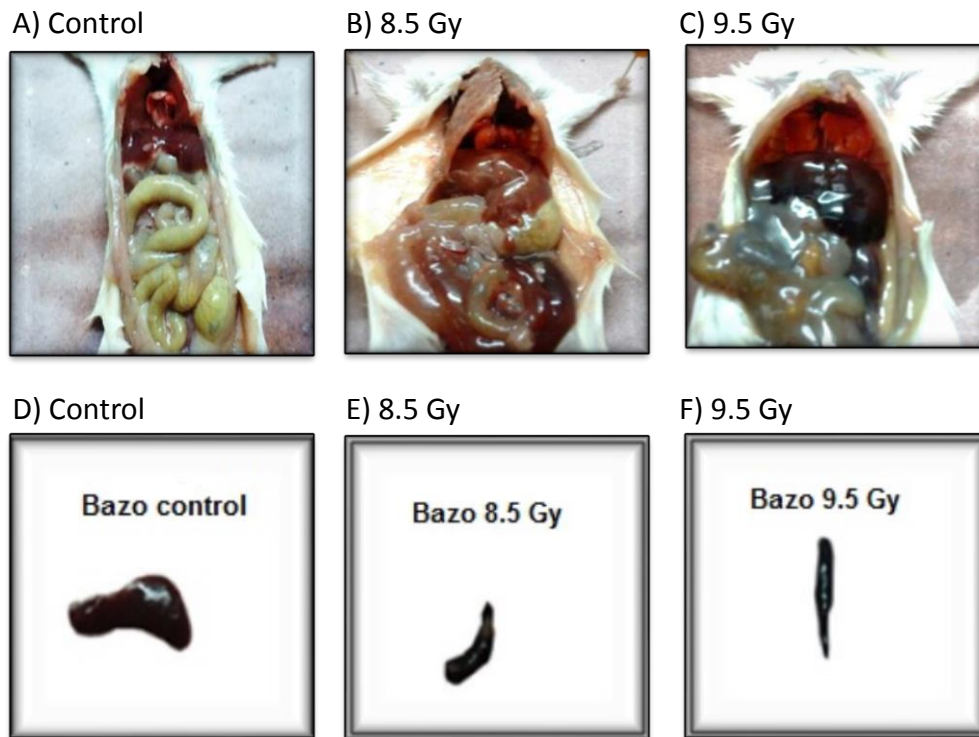


Figura 9. La exposición de ratones a la radiación gamma induce daño en sus órganos internos. Efecto de la radiación en los órganos internos de ratones sometidos a una dosis de 8.5 o 9.5 Gy. A Intestino de un control sin radiación. B Intestino irradiados con 8.5 Gy. C Intestino irradiado con 9.5 Gy. D Bazo de un control sin radiación. E Bazo irradiados con 8.5 Gy. F Bazo irradiados con 9.5 Gy.

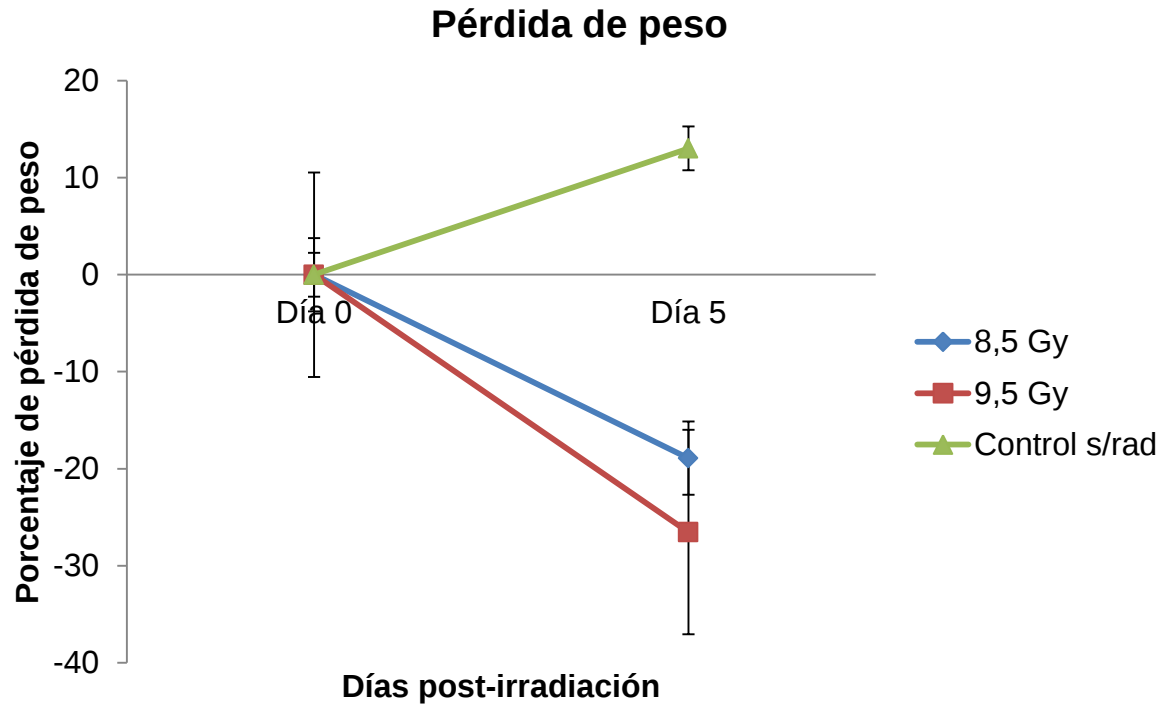


Figura 10. La exposición de ratones a la radiación gamma induce pérdida de peso. Efecto de la radiación en la pérdida de peso de ratones expuestos a una dosis de 8.5 o 9.5 Gy

Tabla 3. La exposición de ratones a la radiación gamma induce pérdida de peso.

Pérdida de peso post-radiación		
	Peso antes de la radiación (Día cero)	Peso después de la radiación (Día cinco)
Control sin radiación	20,26 ± 0,358 (g)	22,851 ± 0,222 (g) (13 %)
Exposición a 8.5 Gy	21,812 ± 0,302 (g)	17,177 ± 0,869 (g) (-18,9 %)
Exposición a 9.5 Gy	21,586 ± 0,412 (g)	15,836 ± 0,967 (g) (-26,5 %)

Efecto de la radiación en la pérdida de peso en gramos y porcentaje de ratones expuestos a una dosis de 8.5 o 9.5 Gy.

7.5 El trasplante de células mononucleadas de sangre periférica de ratones tratados con CasNa, induce una mayor supervivencia en ratones irradiados letalmente

Finalmente establecida una dosis de radiación se procedió a realizar el trasplante de CMN movilizadas a SP. Una vez realizado el trasplante, se evaluó la pérdida de peso y recuperación del mismo como un criterio del éxito en primera instancia, durante un periodo máximo de 30 días después del trasplante; por lo cual tres días antes del trasplante se pesaron los grupos receptores tomando este como el peso inicial, horas antes de ser sometidos a la radiación y recibir el trasplante fueron pesados nuevamente, se observó que los grupos aumentaban su peso entre 1-5 %, al registrar nuevamente el peso pero esta vez tres días después del trasplante observamos una reducción de entre el 10 y 25 %, y el cual siguió disminuyendo los siguientes días en los grupos trasplantados con SP de vehículo y DUO, así como los de MO, en cuanto a las condiciones restantes mostraron una pérdida de peso durante los primeros tres días pero después aumento a partir del día seis, en el día doce todos los grupos sobrevivientes comenzaron a recuperar su peso y en el día 18 la mayoría habían recuperado su peso inicial, en el día treinta post-trasplante el peso incrementaba o se mantenía constante pero ya no descendió después de este día (Figura 11).

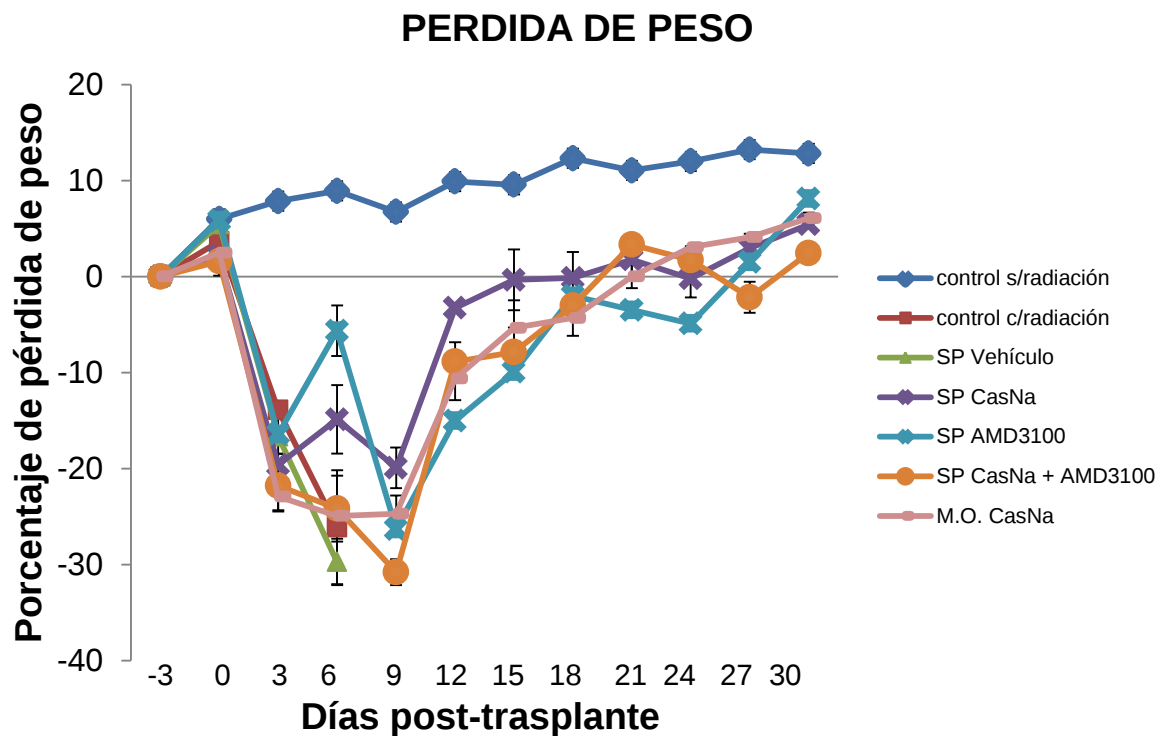


Figura 11. El trasplante permite la recuperación del peso de ratones irradiados. Porcentaje de pérdida y recuperación de peso de ratones irradiados y trasplantados con 2×10^6 de CMN obtenidas de SP de ratones inoculados con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (vehículo), 1 mL de caseinato de sodio (CasNa) (0.1 g/mL), 1 mL de AMD3100 (5 mg/kg) o DUO (CasNa + AMD3100) (0.1 g/mL+5 mg/kg), o ratones trasplantados con CMN de MO de ratones tratados con vehículo o CasNa. n=10 por grupo. Durante los primeros 30 días post-trasplante.

Por otro lado el seguimiento de la supervivencia post-trasplante fue evaluado durante 26 semanas (6 meses) y encontramos que el trasplante de CMN obtenidas de SP de ratones tratados con vehículo mantiene una supervivencia del 10% por menos de dos semanas, en cuanto al trasplante de CMN movilizadas con AMD3100 la supervivencia fue del 10% durante 19 semanas, mientras tanto el trasplante de CMN provenientes del tratamiento de DUO logra mantener una supervivencia del 20% durante 26 semanas, por el contrario CMN de SP de ratones tratados con CasNa mostró una supervivencia del 40% durante 24 semanas y del 30% durante 26 semanas.

Al mismo tiempo se realizó un trasplante de CMN obtenidas de MO de ratones tratados con vehículo o con CasNa, en el primer grupo se observó una supervivencia de 18 semanas, mientras que para el segundo caso la supervivencia fue del 30% durante 14 semanas pero solo un 10% por 26 semanas (Figura 12).

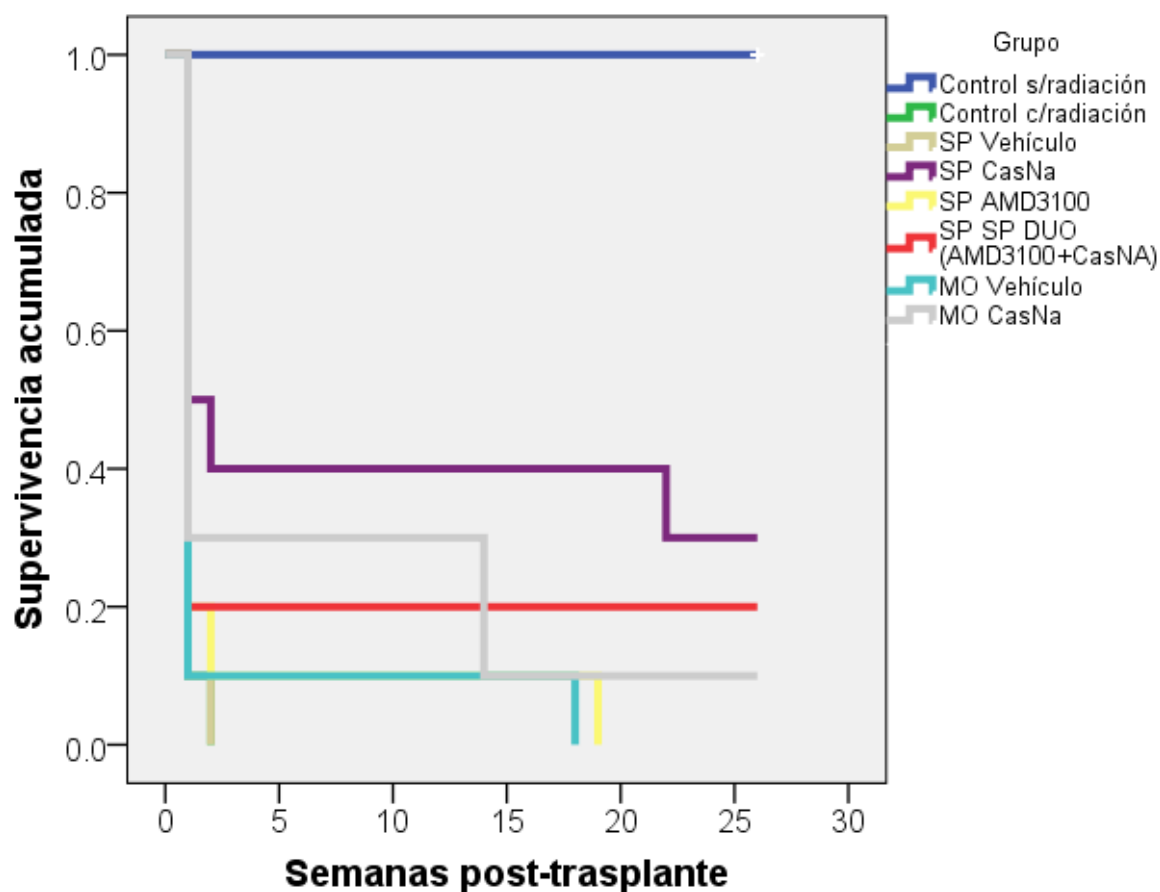


Figura 12. El trasplante de CMN de SP y MO de ratones tratados con CasNa aumenta la supervivencia de ratones letalmente irradiados. Supervivencia de ratones trasplantados o no con 2×10^6 CMN obtenidas de SP de ratones inoculados con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (vehículo), 1 mL de caseinato de sodio (CasNa) (0.1 g/mL), 1 mL de AMD3100 (5 mg/kg) o DUO (CasNa+AMD3100) (0.1 g/mL+5 mg/kg), y ratones trasplantados con CMN de MO de ratones tratados con vehículo o CasNa. n=10 por grupo. Kaplan Meyer

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la actualidad se realizan anualmente cerca de 60,000 trasplantes de HSC/HPC como una estrategia terapéutica preferente contra varios tipos de cáncer, enfermedades hematológicas, autoinmunes, etc., el objetivo de este procedimiento consiste en la reconstitución del sistema hematopoyético de pacientes cuya MO ha sido dañada o destruida a causa del uso de quimioterapia, radioterapia (o la combinación de ambas), las cuales inducen un estado de mielosupresión universalmente mortal en ausencia de trasplante de HSC/HPC provenientes de cualquier fuente, ya sea MO, SP o cordón umbilical (Bishop, 2009; American Cancer Society, 2012; Shirvaikar *et al.*, 2012).

Aunque el número de HSC/HPC es muy bajo en SP (0.01-0.05 %), es posible incrementar su número mediante el proceso conocido como movilización (Greenbaum & Link, 2010). Se sabe que este fenómeno de movilización puede ser inducido farmacológicamente mediante el uso de una gran cantidad de moléculas como las citocinas, quimiocinas y algunos quimioterapéuticos (Nervi *et al.*, 2006). La principal limitante del uso de movilizadores es el riesgo de una insuficiente recolección de HSC/HPC, además de citotoxicidad y efectos secundarios, por lo que existe la necesidad de estrategias novedosas para aumentar el rendimiento de HSC/HPC movilizadas y también con el objetivo de mejorar la calidad del contenido del injerto y los resultados del trasplante (Bakanay & Demirer, 2012).

Existen moléculas diferentes a las citocinas con capacidad de regular la hematopoyesis tal es el caso del el ácido todo transretinoico (ATRA) (Fenaux *et al.*, 2001, 2007), o moléculas como las caseínas (Ramos *et al.* 2004, 2008; Domínguez *et al.*, 2012). En este trabajo se confirma que en ratones sanos la inoculación intraperitoneal de la caseína en la forma de sal, CasNa, aumenta el número de CMN en SP en comparación a ratones tratados solo con el vehículo tal y como había sido reportado anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Silvestre, 2011). De manera interesante, cuando se comparó la movilización inducida por CasNa con AMD3100, una molécula reconocida como movilizadora, se encontró

que aumenta el número de CMN de forma similar (Figura 2), lo cual coincide con similar número de unidades formadoras de colonias (15 veces respecto al control) en células provenientes de sangre periférica, una evidencia de capacidad de movilización de HSC/HPC (Okada *et al.*, 1992; Broxmeyer, *et al.*, 2005; Barquinero, 2009; Challen *et al.*, 2009; Pelus & Farag, 2011, Wognum *et al.*, 2013).

Al analizar el tipo de colonias que se formaban en ambos tratamientos se observó que pertenecían al linaje mieloide principalmente de granulocitos, seguido de colonias de granulocitos-macrófagos y después de colonias de macrófagos pero ninguna eritroide, lo cual corrobora con lo reportado anteriormente donde se mostró que la inoculación *in vivo* de CasNa induce la proliferación y diferenciación del linaje granulocítico principalmente (Domínguez *et al.* 2012). Además, nuestros resultados concuerdan con reportes donde AMD3100 tiende a movilizar progenitores de granulocitos-macrófagos, seguidos de los otros tipos celulares (Broxmeyer *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010). Este conjunto de datos indican que bajo nuestras condiciones de trabajo, el CasNa tiene una capacidad de movilización similar al AMD3100 y tiene potencial para inducir la diferenciación de al menos tres linajes hematopoyéticos de tipo mieloide.

La administración conjunta de CasNa + AMD3100 (DUO) no modificó el número de CMN, colonias y tipo de linaje celular obtenidas de SP en comparación a los tratamientos de CasNa y AMD3100 por separado, lo cual contrasta con reportes donde la administración de G-CSF en combinación con AMD3100 es capaz de movilizar efectivamente un mayor número de HSC/HPC a SP que los tratamientos por separado (Broxmeyer *et al.*, 2005; Flomenberg *et al.*, 2005; Pelus y Fukuda 2008). Desconocemos porque AMD3100 en combinación con CasNa no moviliza un mayor número de CFU, sin embargo sería interesante investigar si CasNa ya induce la máxima movilización no solo de CFU, sino también de HSC/HPC, y por lo cual no presenciamos mayor efecto en el DUO. Ante estos resultados podemos aseverar que CasNa tiene la capacidad de aumentar el número y proliferación de

CMN y HPC que se movilizan a SP y por otro lado podemos asegurar que el efecto de CasNa combinado con AMD3100 no tiene un efecto sinérgico.

El hecho de que bajo nuestras condiciones de trabajo se observara un aumento en el índice esplénico sugiere la posibilidad de que CasNa induzca hematopoyesis extramedular (HE), evento que indica un efecto de movilización (O'Malley *et al.*, 2005), el cual puede deberse a la colonización de HSC/HPC circundantes en SP las cuales se establecen en bazo y después proliferan y se diferencian, lo cual concordaría con reportes donde las HSC/HPC movilizadas se establecen en este órgano iniciando así la HE (Khaldonayini *et al.*, 2003; Kim, 2010; O'Neill, 2012), por otro lado algunos reportes han mostrado que CasNa aumenta los niveles de G-CSF en suero de ratones (Metcalf *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 2012) y a la vez otros trabajos muestran que la administración de esta citocina incrementa el tamaño del bazo varios centímetros después de su inoculación (Stroncek *et al.*, 2004), estos datos aunados a los otros podrían indicar que uno de los mecanismos por los cuales CasNa está movilizando es dirigido por la producción de G-CSF.

Considerando que la prueba contundente de la funcionalidad de las HSC/HPC, es la capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético de un individuo mielosuprimido (Lin & Goodell, 2006; Orkin & Zon, 2008; Wintrobe, 2009), nos preguntamos si las células movilizadas a SP con CasNa en efecto, rescataban de la muerte a ratones letalmente irradiados y con ello mostrar fisiológicamente la presencia de HSC/HPC funcionales.

Con esta finalidad, inicialmente se estableció una dosis de radiación supraletal que indujera mieloablación en ratones de la cepa Balb/c y en consecuencia posibilitara el trasplante de HSC/HPC. En efecto, el objetivo de la radiación como régimen de condicionamiento previo al trasplante, es la eliminación de las células inmunocompetentes de manera rápida y efectiva, no obstante, una dosis por debajo de este umbral podría eliminarlas lentamente o en el peor de los casos no

eliminarlas, de modo que luego del trasplante, el receptor desarrollara la condición de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), por el contrario, una dosis de radiación por arriba del régimen mieloablativo provoca una toxicidad tan alta que la inducción de mortalidad ocurre rápidamente y aún y si se efectúa un trasplante de MO o SP el injerto no es exitoso y sobreviene rápidamente la muerte del receptor (Cui, *et al.* 2002; Duran & Dysco 2009).

Tomado en consideración algunos criterios establecidos por The Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de Los Estados Unidos, tales como los signos de moribundidad, pérdida de peso y daño en órganos internos, se ensayaron dos diferentes dosis de radiación.

En reportes previos se demuestra que 8.5 Gy es efectiva para inducir la mieloablación (Fibbe *et al.*, 1992; Laterveer *et al.*, 1995; Zijlmans *et al.*, 1995, 1998), además de que se ha mostrado que ratones de la cepa Balb/c son radiosensibles a dosis 8.8 Grays (Gy) (Hansom *et al.*, 1987; Duran & Dysco, 2009), y otra de 9.5 Gy que se sabe, permite la supervivencia de los ratones de la cepa Balb/c después de un trasplante exitoso (de Kruijf *et al.*, 2010). Se encontró que bajo nuestras condiciones, la dosis de 9.5 Gy no permitía la supervivencia de los ratones más allá de seis días mientras que ratones expuestos a dosis de 8.5 Gy supervivían hasta nueve días. Al analizar la presencia de signos físicos que es conocido, aparecen post-exposición a radiación, tales como la postración, la inapetencia, entre otros (Schielke *et al.*, 2004; Duran & Dysco, 2009), observamos que para ambas dosis, estos síntomas de morbilidad se presentaban en el mismo tiempo y la diferencia era poco notoria, sin embargo al observar que la pérdida de peso en ratones expuestos a una dosis de 8.5 Gy era menor del 20% mientras que en ratones expuestos a la dosis de 9.5 Gy la pérdida era mayor del 30%, algunas instituciones determinan a la pérdida de peso como un método típico de limitar la gravedad de los procedimientos experimentales en animales, limitando a esta pérdida a no ser mayor del 20% (Duran & Dysco, 2009), a la vez observamos que la dosis de 9.5 Gy era mucho más agresiva en órganos internos como el intestino, y bazo a diferencia de la dosis de 8.5 Gy, que si bien, también afecta a estos

órganos, el daño observado no era tan grave (Figura 8). Tal como indican algunos reportes la radiación afecta principalmente a las células que proliferan rápidamente y por lo tanto afecta a los tejidos cuyo recambio celular es constante tal es el caso del intestino, los gametos y la MO, en cambio las células que no se dividen constantemente son radioresistentes, es decir, que la radiación no las afecta de manera similar a las que sí están en constante división (Lindell & Dobson, 1964; Cherry *et al.*, 2000; Acosta y Cañete, 2005; Goodman, 2010), esta evidencia sumada a las anteriores nos permitió afirmar que la dosis de 9.5 Gy era excesiva y por lo tanto decidimos que la dosis efectiva para realizar un trasplante de HSC era la dosis de 8.5 Gy.

Una vez establecido un modelo de mielosupresión y estudiada la capacidad del CasNa para regular la hematopoyesis e inducir movilización a SP y como prueba contundente de esta movilización se realizó un trasplante de CMN de ratones tratados con CasNa comparándolo con aquellos tratados con un reconocido movilizador como el AMD3100, CasNa con AMD3100 (DUO) o vehículo. Los resultados mostraron que el CasNa tiene mayor éxito de sobrevida durante más de 26 semanas en comparación con el grupo vehículo los cuales sostuvieron una supervivencia menor de dos semanas, lo cual es de esperarse considerando que el número circundante de HSC/HPC en SP es muy bajo (0.01-0.05%) (Greenbaum & Link, 2010) e imposibilita el restablecimiento de la hematopoyesis. Por otro lado observamos que las CMN de SP obtenidas después de la inoculación de AMD3100, al ser trasplantadas en ratones irradiados letalmente sostienen una baja supervivencia durante 19 semanas, similar a lo reportado por He *et al.*, (2014) que muestra que células movilizadas con AMD3100 sostiene escasos 25 días la supervivencia de ratones irradiados, mientras que DUO solo logra mantener una supervivencia baja durante 26 semanas, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en otros trabajos donde la combinación de AMD3100 con otros movilizadores, muestra sostener supervivencias hasta del 100% (Singh *et al.*, 2010, 2012, 2014, He *et al.*, 2014).

De los datos observados podemos concluir que bajo nuestras condiciones experimentales CasNa muestra mejor efecto de movilización en cuanto a lograr mantener una mayor supervivencia a largo plazo comparado con AMD3100 la combinación de ambas, no sabemos cuál sea la posible razón por la que CasNa muestre por si solo mejores resultados pero una posible respuesta puede ser su capacidad de aumentar ciertas citocinas en suero, tales como el G-CSF y GM-CSF (Metcalf *et al.*, 1996; Santiago *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2012), dos moléculas conocidas por su capacidad para poder inducir la movilización y que hasta antes de 2009 eran las únicas aprobadas por la FDA para inducir este evento clínicamente (Nervi *et al.*, 2006; Cashen *et al.*, 2007).

A la vez, podemos tomar en consideración la existencia de 2 tipos de HSC las HSC de largo plazo (HSC-LT) y las HSC de corto plazo (HSC-ST), las primeras son capaces de sostener la hematopoyesis de un individuo toda su vida, en cuanto a las segundas solo pueden sostenerla entre 8 a 16 semanas, ambas son necesarias en un trasplante, puesto que las HSC-ST ciclan constantemente por lo cual son necesarias en primer instancia para recobrar la hematopoyesis en un individuo mielosuprimido durante los primeros días post-trasplante, mientras las HSC-LT ciclan lentamente, pero son las encargadas de repoblar la MO a largo plazo (Weisman, 2000; Orkin & Zon, 2008; Benveniste *et al.*, 2010; Challen, *et al.*, 2010; de Kruijf *et al.*, 2010; Mayle *et al.*, 2012; Schuettepelz y Link, 2012; Montrone *et al.*, 2013), tomando en cuenta los datos *in vitro* e *in vivo* que obtuvimos, podemos sugerir que CasNa está aumentando el número de HSC-ST y HPC en SP por lo cual logra sostener una mayor supervivencia en primer instancia pero a la vez también está logrando movilizar HSC-LT porque logra mantener supervivencias durante más de 26 semanas y esta podría ser otra posible respuesta a su capacidad de sostener mayor supervivencia que incluso nuestra molécula control de movilización.

Paralelamente a este experimento se realizó un trasplante de CMN de MO (como control de trasplante) de ratones tratados con CasNa o vehículo y observamos que la supervivencia de ratones trasplantados con CMN de CasNa tuvieron una supervivencia baja durante 26 semanas, en contraste de los ratones trasplantados con CMN de vehículo que solo sostuvieron una escasa supervivencia por 18 semanas. Si comparamos el trasplante de CMN de ratones tratados con CasNa de SP con el de MO podemos observar que el trasplante de SP es más efectivo que el de MO mostrando mayor supervivencia, los reportes clínicos más recientes revelan que las tasas de sobrevida libre de enfermedad a largo plazo son mayores en SP por ejemplo las estadísticas indican que enfermedades como las leucemias agudas el trasplante de MO obtienen sobrevidas del 50% mientras el trasplante de SP logra tasas del 60%, en linfomas y mieloma múltiple el porcentaje es de 40% vs 50%, mientras que en leucemias mieloides crónicas el porcentaje de supervivencia es del 65% para MO mientras que para SP la supervivencia es del 81% (Cheuk, 2013), ante los datos obtenidos podemos asegurar que el trasplante de células movilizadas con CasNa es mejor que el trasplante de MO de ratones sanos o tratados con CasNa, por lo cual podríamos pensar que CasNa presenta un mecanismo que mejora la calidad del injerto de células movilizadas, ya sea gracias a las características antes mencionadas o inclusive presente una capacidad radioprotectiva como lo denominarían algunos autores (Singh *et al.*, 2012), sin embargo, sea cual sea el mecanismo por el cual está actuando CasNa lo observado en este trabajo nos indica su capacidad para ser una nueva alternativa terapéutica para la realización del trasplante de HSC solo se necesita mejorar la estrategia para poder obtener mejores resultados.

9. CONCLUSIONES

- CasNa moviliza células troncales/progenitoras hematopoyéticas funcionales a sangre periférica capaces de rescatar a ratones mielosuprimidos.
- Bajo nuestras condiciones de trabajo, al observar la formación de colonias, CasNa tiene un efecto de movilizador similar al AMD3100, pero no tienen efecto aditivo o sinérgico.
- La dosis de radiación establecida induce mieloablación y muerte en ratones sometidos a esta.
- El trasplante de células movilizadas a sangre periférica con CasNa es más efectivo para inducir supervivencia que AMD3100.

10. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se mostró la capacidad de CasNa para inducir movilización de células troncales/progenitoras (HSC/HPC) a sangre periférica mediante la formación de colonias y su capacidad de rescatar a ratones mielosuprimidos que recibieron un trasplante de estas células, por lo cual CasNa podría ser utilizado como una alternativa terapéutica del trasplante de HSC/HPC sin embargo aún faltan algunos estudios para demostrar todo su potencial como movilizador por lo cual se recomienda en trabajos posteriores:

- Evaluar si el trasplante secundario de CMN de MO, procedentes de ratones trasplantados con células troncales/progenitoras hematopoyéticas movilizadas a SP con CasNa, tienen la capacidad para rescatar de la muerte a ratones irradiados letalmente.
- Evaluar la capacidad de reconstitución hematopoyética de los linajes mieloide y linfoide de células movilizadas y trasplantadas en ratones irradiados

11. BIBLIOGRAFÍA

Acosta J, Cañete S, 2005. Manual De Radioprotección. Editorial: Universidad de Málaga, España. Pp. 6. ISBN: 978-84-9747-180-0

Ávalos M, Quintana R, Brandan N, 2002. Citoquinas. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, Cátedra de Bioquímica. Disponible en <http://www.med.unme.edu.ar>. Acceso abril 20, 2014.

American Cancer Society, 2012. Trasplante de células madre (trasplantes de sangre periférica, médula ósea y sangre del cordón umbilical). Página web <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002991-pdf.pdf>. Acceso septiembre 10, 2013.

Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Suda T, 2009. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. Annals of the New York Academy of Sciences, 1176(1): 36-46.

Bakanay S, Demirer T, 2011. Novel agents and approaches for stem cell mobilization in normal donors and patients. Bone Marrow Transplantation, 47(9): 1154-1163.

Barquinero J, 2009. Células madre hematopoyéticas. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. En: Pablo F., Cascales M., 2009. Células madre y terapia regenerativa. Edición Real Academia Nacional de farmacia Madrid. Pp 61-81. ISBN: 978-84-936890-6-3

Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, Iscove N, 2010. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. Cell Stem Cell, 6(1): 48-58.

Bishop MR, 2009. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Editorial: National Cancer Institute. Estados Unidos. Pp 6. ISBN: 978-0-387-78579-0

Bonig H, Papayannopoulou T, 2013. Hematopoietic stem cell mobilization: updated conceptual renditions. Leukemia, 27(1): 24-31.

Broxmeyer H, Orschell C, Clapp D, Hangoc G, Cooper S, Plett P, Liles W, Li X, Graham B, Campbell T, Calandra G, Bridger G, Dale D, Srouf E, 2005. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. The Journal of experimental medicine, 201(8): 1307-1318.

Broxmeyer H, Srouf E, Orschell C, Ingram D, Cooper S, Plett P, Mead L, Yoder M, 2006. Cord blood stem and progenitor cells. Methods Enzymol. 419: 439-473.

Buza N. 2007. Cytokine regulation of hematopoietic stem cells and lymphopoiesis. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la Universidad de Lund, con la aprobación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Lund.

Can A, 2008. Haematopoietic stem cells niches: interrelations between structure and function. Transfusion and Apheresis Science, 38(3): 261-268.

Calvi L, Adams G, Weibrecht K, Weber J, Olson D, Knight M, Martin R, Schipani E, Divieti P, Bringhurst F, Milner L, Kronenberg H, Scadden D. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature, 425(6960): 841-846.

Carlo C, Di Nicola M, Milani R, Guidetti A, Magni M, Milanese M, Longoni P, Matteucci P, Formelli F, Ravagnani F, Corradini P, Gianni AM 2004. Use of recombinant human growth hormone (rhGH) plus recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) for the mobilization and collection of CD34+ cells in poor mobilizers. *Blood*, 103(9): 3287-3295.

Cashen A, Lazarus H, Devine S, 2007. Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF?. *Bone marrow transplantation*, 39(10): 577-588.

Challen G, Boles N, Lin K, Goodell M, 2009. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry Part A*, 75(1): 14-24.

Challen G, Boles N, Chambers S, Goodell M, 2010. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF- β 1. *Cell stem cell*, 6(3): 265-278.

Cherry R, Upton A, Lodde G, Porter S. Radiaciones Ionizantes riesgos Generales. *Enciclopedia de la salud y seguridad en el trabajo: OIT*.

Cheuk D, 2013. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World journal of transplantation*, 3(4): 99-112.

Chotinantakul K, Leenansaksiri W, 2012. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone marrow research*. 2012: 270425

Cui Y, Hisha H, Yang G, Fan T, Jin T, Li Q, Lian Z, Ikehara S, 2002. Optimal protocol for total body irradiation for allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Bone marrow transplantation*, 30(12): 843-849.

Devine H, Tierney D, Schmit K, McDermott K., 2010. Mobilization of hematopoietic stem cells for use in autologous transplantation. *Clinical journal of oncology nursing*, 14(2): 212-222.

de Kruijf E, Hagoort H, Velders G, Fibbe W, and Van M. 2010 Hematopoietic stem and progenitor cells are differentially mobilized depending on the duration of Flt3-ligand administration. *Haematologica*, 95(7): 1061-1067.

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

Domínguez V, Santana O, Moreno L, Aguiñiga I, Ledesma E, Marroquin R, García AL, Weiss B, Marché A, Monroy A, Mora L, Santiago E, 2012. Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis. *Inflammation Research*, 61(4): 367-373.

Duran y Dysko, 2009. Principles of Bone Marrow Transplantation (BMT): Providing Optimal Veterinary and Husbandry Care to Irradiated Mice in BMT Studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 48(1): 11.

Fibbe W, Hamilton M, Laterveer L, Kibbelaar R, Falkenburg J, Visser L, Willemze R, 1992. Sustained engraftment of mice transplanted with IL-1-primed blood-derived stem cells. *The Journal of Immunology*, 148(2): 417-421.

Fenaux P, Chomienne C, Degos L, 2001. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Seminars in hematology*, 38(1): 13-25.

Fenaux P, Wang Z, Degis L, 2007. Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids. In *Acute Promyelocytic Leukemia*, 313: 101-128.

Flomenberg N, Devine S, DiPersio J, Liesveld J, McCarty J, Rowley S, Vesole D, Badel K, Calandra G, 2005. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood*, 106(5): 1867-1874.

Forgáčová K, Nečas E, 2013. Availability of haematopoietic niches for transplanted stem cells. *Folia Biologica (Praha)*, 59(1): 1–14.

Fukuda S, Broxmeyer H, Pelus L, 2005. Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1 α (CXCL12)/CXCR4 axis. *Blood*, 105(8): 3117-3126.

Goodman T. Ionizing radiation effects and their risk to humans. ImageWisely.org. American College of Radiology. Disponible en: <http://www.imagewisely.org/Imaging-Modalities/Computed-Tomography/Imaging-Physicians/Articles/Ionizing-Radiation-Effects-and-Their-Risk-to-Humans>. Acceso diciembre 28, 2013.

Gómez D, Flores J, Cantú O, Gutiérrez C, 2012. Utilidad del trasplante de células hematopoyéticas en la leucemia mieloide aguda. *Revista de Hematología*, 13(2): 74-79.

Greenbaum A, Link D, 2010. Mechanisms of G-CSF-mediated hematopoietic stem and progenitor mobilization. *Leukemia*, 25(2): 211-217.

Greinix H, Worel N, 2009. New agents for mobilizing peripheral blood stem cells. *Transfusion and Apheresis Science*, 41(1): 67-71.

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

Hanson W, Fry R, Sallese A, Frischer H, Ahmad T, Ainsworth E, 1987. Comparison of intestine and bone marrow radiosensitivity of the BALB/c and the C57BL/6 mouse strains and their B6CF1 offspring. *Radiation Research*, 110(3): 340–352.

He S, Chu J, Vasu S, Deng Y, Yuan S, Zhang J, Fan Z, Hofmeister C, He X, Marsh H, Devine S, Yu J, 2014. FLT3L and Plerixafor Combination Increases Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Leads to Improved Transplantation Outcome. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 20(3): 309-313

Hendrix C, Flexner C, MacFarland R, Giandomenico C, Fuchs E, Redpath E, Bridger G, Henson G, 2000. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(6): 1667-1673.

Henon P, Liang H, Beck-Wirth G, Eisenmann J, Lepers M, Wunder E, Kandel G, 1992. Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 9(4): 285–291.

Hoggatt J, Pelus L, 2011. Many mechanisms mediating mobilization: an alliterative review. *Current opinion in hematology*, 18(4): 231.

Hopman R, DiPersio J, 2014. Advances in Stem Cell Mobilization. *Blood Reviews*, 28(1): 31-40

Ihle J, Kerr I, 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in Genetics*, 11(2): 69-74.

Iwasaki H, Suda T, 2010. Hematopoietic stem cells and their niche. In *Hematopoietic Stem Cell Biology*. Humana Press, p. 37-55.

Jacobsen S, Ruscetti F, Ortiz M, Gooya J, Keller J, 1994. The growth response of Lin-Thy-1+ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy of multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. *Experimental hematology*, 22(10): 985-989.

Jarden M, 2009. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Department of Hematology. The Finsen Center and The University Hospitals Center for Nursing and Care Research Copenhagen University Hospital, pp 1, 2. ISBN: 978-87-90769-07-9

Johns J, Christopher M, 2012. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. *Veterinary Pathology Online*, 49(3): 508-523.

Khaldoyanidi S, Sikora L, Broide D, Rothenberg M, Sriramaraio P, 2003. Constitutive overexpression of IL-5 induces extramedullary hematopoiesis in the spleen. *Blood*, 101(3): 863-868.

Kiel M, Morrison S, 2008. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 8(4): 290-301.

Kim C, 2010. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of blood medicine*, 1: 13-19.

King A, Horowitz D, Dillon S, Levin R, Farese A, MacVittie T, Pelus L, 2001. Rapid mobilization of murine hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties and evaluation of hematopoietic progenitor cell mobilization in rhesus monkeys by a single injection of SB-251353, a specific truncated form of the human CXC chemokine GRO β . *Blood*, 97(6): 1534-1542.

Kondo M, Wagers A, Manz M, Prohaska S, Scherer D, Beilhack G, Shizuru J, Weissman I, 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annual review of immunology*, 21(1): 759-806.

Kopp H, Avecilla S, Hooper A, Rafii S, 2005. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology*, 20(5): 349-356.

Körbling M, Freireich E. 2011. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*, 117(24): 6411-6416.

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

Lapidot, T, Dar A, Kollet O, 2005. How do stem cells find their way home?. *Blood*, 106(6): 1901-1910.

Laterveer L, Lindley I, Hamilton M, Willemze R, Fibbe W, 1995. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelo-lymphoid repopulating ability. *Blood*, 87(2): 781-788.

Lemoli R, D'Addio A., 2008. Hematopoietic stem cell mobilization. *Haematologica*, 93(3): 321-324.

Lemoli R, 2012. New strategies for stem cell mobilization. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1): e2012066.

Levesque J, Helwani F, Winkler I, 2010. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia*, 24(12): 1979-1992.

Lindell R, Dobson L, 1964. Las radiaciones ionizantes y la salud. Editorial: Ginebra: Organización Mundial de la Salud. pp 9-11

Lotem J, Sachs L, 1985. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins *in vivo*: regulation by compounds that induce inflammation. *International Journal of Cancer*, 35(1): 93-100.

Martinez C, Urbano A, Rozman M, Rovira M, Marin P, Montfort N, Carreras E, Monserrat E, 1999. Effects of short-term administration of G-CSF (filgrastim) on bone marrow progenitor cells: analysis of serial marrow samples from normal donors. *Bone Marrow Transplant*. 23(1): 15-19.

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

Matsumoto Y, Iwasaki H, Suda T, 2011. Maintenance of Adult Stem Cells: Role of the Stem Cell Niche. En Adult Stem Cells Biology and Methods of Analysis. Humana Press. p. 35-55.

Mayani H, 2003. A glance into somatic stem cell biology: Basic principles, new concepts and clinical relevance. Archives of medical research, 34(1): 3-15

Mayani H, Flores E, Pelayo R, Montesinos J, Flores P, Chávez A, 2007. Hematopoyesis. Cancerología. 2: 95-107.

Mayle A, Luo M, Jeong M, Goodell MA, 2012. Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. Cytometry Part A, 83(1): 27-37.

Meisel H, 1997. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. Peptide Science, 43(2): 119-128.

Metcalf D, Robb L, Dunn A, Mifsud S, Rago L, 1996. Role of Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and Granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. Blood, 88(10): 3755-3764.

Montrone C, Kokkaliaris K, Loeffler D, Lechner M, Kastenmüller G, Schroeder T, Ruepp A, 2013. HSC-explorer: a curated database for hematopoietic stem cells. PLoS One, 8(7): 1-8.

Mohty M, Ho A, 2011. In and out of the niche: perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*, 39(7): 723-729.

Morstyn G, Brown S, Gordon M, Crawford J, Demetri G, Rich W, McGuire B, Foote M, McNiece I. 1994. Stem cell factor is a potent synergistic factor in hematopoiesis. *Oncology*, 51(2): 205-214.

Motabi I, DiPersio J, 2012. Advances in stem cell mobilization. *Blood reviews*, 26(6): 267-278.

Naveiras O, Nardi V, Wenzel P, Hauschka P, Fahey F, Daley G, 2009. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*, 460(7252): 259-263.

Nervi B, Link D, DiPersio J, 2006. Cytokines and Hematopoietic Stem Cell Mobilization. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(3): 690-705.

Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T, 1992. *In vivo* and *in vitro* stem cell function of c-kit-and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood*, 80(12): 3044-3050.

Oliveros J, Sandoval C, Cires R, Blum M, Tafur A, 2003. Trasplante de células hematopoyéticas. *Revista Medicina*, 9(2): 174-185.

O'Malley D, Kim Y, Perki S, Baldrige L, Juliar B, Orazi A. Morphologic and immunohistochemical evaluation of splenic hematopoietic proliferations in neoplastic and benign disorders. *Modern Pathology*, 18(12): 1550-1561.

O'Neill HC, 2012. Niches for extramedullary hematopoiesis in the spleen. *Niche*, 1: 12-6.

Orkin SH, Zon LI, 2008. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132(4): 631-644.

Oyala A, Pérez M, 2011. Bases farmacológicas para el uso de quimioterapia. En: Oyala, A. 2011. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pediatría, principios básicos. Editores de textos mexicanos, México, pp 41-55.

Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G, Ricevuti G, 1993. The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Rivista europea per le scienze mediche e farmacologiche= European review for medical and pharmacological sciences= Revue europeenne pour les sciences médicales et pharmacologiques*, 15(2): 71-81.

Pelayo R y Vadillo E, 2011. El sistema hematopoyético a partir de células troncales, en: Pelayo R, Santa-Olaya J, Velasco I, et al. 2011. Células troncales y medicina regenerativa. México, Pp 144 ISBN 978-607-02-2568-0

Pelus L, 2008. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. *Current Opinion in Hematology*, 15(4): 285.

Pelus L, Fukuda S, 2008. Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia*, 22(3): 466-473.

Pelus L, Farag S, 2011. Increased mobilization and yield of stem cells using plerixafor in combination with granulocyte-colony stimulating factor for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Stem Cells and c Cloning: Advances and Applications*, 4: 11-22.

Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T, 2002. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunology*, 3(7): 687-694.

Pusic I, DiPersio J, 2008. The use of growth factors in hematopoietic stem cell transplantation. *Current Pharmaceutical Design*, 14(20): 1950-1961.

Pusic I, Dipersio J, 2010. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR 4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Current opinion in hematology*, 17(4): 319-326.

Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E, 2004. Sodium caseinate induces expression and secretion of murine multipotent myeloid cell line 32D macrophage colony-stimulating factor. *Archives of medical Research*, 35(2): 109-113.

Ramos G, Weiss B, Melo B, Córdova Y, Ledesma E, Bustos S, Silvestre O, Aguiñiga I, Sosa N, Martínez I, Sánchez L, Garcia A, Santiago E. 2008. Alpha-, beta- and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiology*, 213(2): 133-141.

Rivera R, 2011. Historia del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pediatría. En Oyala, A. 2011. *Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pediatría, principios básicos*. Editores de textos mexicanos, México, pp 3-10.

Sahin A, Buitenhuis M, 2012. Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. *Cell Adhesion & Migration*, 6(1): 39-48.

Santiago E, Mora L, Bautista M, Montesinos J, Martínez I, Ramos G, Zambrano R, Monroy A, Weiss B, Ledesma E, Aguiñiga, I, 2010. Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology*, 215(4): 332-339.

Sarrazin S, Sieweke M, 2011. Integration of cytokine and transcription factor signals in hematopoietic stem cell commitment. *Seminars in immunology*, 23(5): 326-334

Scadden D, 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441(7097): 1075-1079.

Schielke J, Kiem H, Liggitt D, Bielefeldt H, 2004. Radiation-induced glioblastoma multiforme in two adult baboons (*Papio cynocephalus anubis*). *Comparative Medicine*, 54(3): 327-332.

Schmitz N, Linch D, Dreger P, Goldstone A, Boogaerts M, Ferrant A, Demuynck H, Link H, Zander A, Barge A. 1996. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *The Lancet*, 347(8998): 353-357.

Schuettpelz LG, Link DC 2013. Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation. *Frontiers in Immunology*, 4:1-9.

Seita J, Weissman I, 2010. Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 2(6): 640-653.

Shi M, Li M, Ikehara S, 2013. Novel conditioning regimens for bone marrow transplantation. Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy 3: 1–9.

Shirvaikar N, Marquez, LA, Janowska A, 2012. Hematopoietic stem cell mobilization and homing after transplantation: The role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. Biochemical Research International, 1835(1): 1-11.

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

Silvestre O, 2011. Efecto del caseinato de sodio (CasNa) sobre la movilización de células progenitoras hematopoyéticas Tesis de Maestría. FES Zaragoza, UNAM.

Singh V, Brown D, Kao T, Seed T, 2010. Preclinical development of a bridging therapy for radiation casualties. Experimental Hematology, 38(1): 61-70.

Singh V, Wise S, Singh P, Ducey E, Fatanmi O, Seed T, 2012. α -Tocopherol succinate–and AMD3100-mobilized progenitors mitigate radiation-induced gastrointestinal injury in mice. Experimental hematology, 40(5): 407-417.

Singh V, Wise S, Fatanmi O, Beattie L, Ducey E, Seed T, 2014. Alpha-tocopherol succinate-and AMD3100-mobilized progenitors mitigate radiation combined injury in mice. Journal of radiation research, 55(1): 41-53.

Stroncek D, Dittmar K, Shawker T, Heatherman A, Leitman S, 2004. Transient spleen enlargement in peripheral blood progenitor cell donors given G-CSF. *Journal of Translational Medicine*, 2(1): 25.

Suarez B, Lopez A, Lopez C, 2012. Mobilization and homing of hematopoietic stem cells. En *Stem Cell Transplantation* pp. 152-170.

To L, Levesque J, Herbert K, 2011. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood*, 118(17): 4530-4540.

Ugarte F, Forsberg E, 2013. Haematopoietic stem cell niches: new insights inspire new questions. *The European Molecular Biology Organization journal*, 32(19): 2535-2547.

Vadhan S, Murray L, Bueso C, Patel S, Reddy S, Hoots W, Johnston T, Papadopolous N, Hittelman W, Johnston D, Yang T, Paton V, Cohen R, Hellmann S, Benjamin R, Broxmeyer H. 1997. Stimulation of megakaryocyte and platelet production by a single dose of recombinant human thrombopoietin in patients with cancer. *Annals of Internal Medicine*, 126(9): 673-681.

Walstra P, Jenneis R, 1984. *Dairy chemistry and physics*. John Wiley Sons, New York.

Weissman I, 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1): 157-168.

Wintrobe M, 2009. Clinical Hematology. 8 th ed. Philadelphia Lea y Febiger. Pp 35 ISBN: 978-0-7817-6507-7

Wognum B, Yuan N, Lai B, Miller C, 2013. Colony Forming Cell Assays for Human Hematopoietic Progenitor Cells. In Basic Cell Culture Protocols pp. 267-283.

Yin T, Li L, 2006. The stem cells niches in bone. Journal of Clinical Investigation, 116(5): 1195-1201.

Zhang C, Lodish H, 2008. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. Current Opinion in Hematology, 15(4): 307–311.

Zijlmans J, Visser J, Kleiverda K, Kluin M, Willemze R, Fibbe W, 1995. Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(19): 8901-8905.

Zijlmans J, Visser J, Laterveer L, Kleiverda K, Heemskerk D, KLUIN P, Willemze R, Fibbe W, 1998. The early phase of engraftment after murine blood cell transplantation is mediated by hematopoietic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(2): 725-729.

12. ANEXOS

Preparación de reactivos:

Suero de ratón

El suero de ratón se obtuvo bajo condiciones de esterilidad de ratones de la cepa Balb/c, se obtuvo la sangre de los ratones por plexo axilar en tubos de plástico estériles y se centrifuga a 1500 revoluciones por minutos (rpm) por 5 minutos, se dejó en refrigeración (4°C) de una hora o hasta 12 horas y después en campana de flujo laminar se obtuvo el suero cuidando de no hemolizar las muestras (200µL/mL/ratón), se inactivo antes de usarse. Para la inactivación se puso en un baño de agua a 56°C por 30 minutos con el propósito de inactivar proteínas del complemento y se homogenizo suavemente cada 10 min. Se Almaceno a -20°C.

PBS (solución buffer de fosfatos)

Esta solución de sales de fosfato conserva la fisiología celular. Para preparar 1L de PBS se necesitó:

1L Agua bidestilada

8.0 g Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma, Chem, USA)

0.2 g Cloruro de potasio (KCl) (Sigma, Chem, USA)

2.16 g Fosfato monoácido de sodio (Na₂HPO₄) (Sigma, Chem, USA)

0.2 g Fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄) (Sigma, Chem, USA)

Las sales de NaCl, KCl y KH₂PO₄ se disolvieron completamente una por una en 800 ml de agua bidestilada. Una vez disuelto todo se ajustó el pH de 7.2-7.4 con Na₂HPO₄ y se aforo al volumen final de 1L. Se esterilizo por autoclave, se dejó enfriar y se almaceno a 4°C.

PBS + suero de ratón al 1%

Se agregó 1 mL de suero de ratón inactivado por cada 100 mL de PBS en condiciones estériles.

CasNa

Se solubilizó 0.1g/ml de CasNa (Spectrum, New Brunswick, NJ) en PBS, y posteriormente se esterilizó por autoclave, el CasNa se preparó minutos antes de la inoculación.

METHOCULT

Es un medio semisólido a base de metilcelulosa (Methocult; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá), el cual contiene un cóctel de factores de crecimiento, tales como: factor estimulador de células troncales recombinante de ratón (rmSCF), interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3), interleucina-6 recombinante humana (rhIL-6) y eritropoyetina recombinante humana (rhEpo). Se almacenó a -20°C y se descongeló horas antes de su uso con agitación suave.

FICOLL

Ficoll (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) es un gradiente de densidad ($\delta=1.077\text{g/ml}$) se mantuvo a 4°C y en oscuridad.

AGUA ÁCIDA pH 3

Agua potable se acidificó con ácido clorhídrico concentrado y posteriormente se esterilizó por autoclave.

Manejo de los animales

Medidas de esterilidad para la manipulación de los ratones donadores

Los ratones donadores fueron manipulados bajo las reglas del bioterio.

La administración de los tratamientos fue en la vía intraperitoneal, inoculando un volumen máximo de 1 mL/ratón con una aguja de 25G.

Medidas de esterilidad para la manipulación de los ratones receptores

Los ratones receptores fueron manipulados bajo las reglas del bioterio, una semana antes del trasplante se condicionaron con agua ácida a pH 3.

El día que recibieron el trasplante, fueron colocados en microaisladores (RISMART, S. A. DE C. V. D.F. México) y se transportaron, al irradiador, antes de efectuar la irradiación, la mesa se desinfecto con alcohol al 70% y a partir de ese momento se manipularon con precaución, usando bata, guantes y cubrebocas fue empleado como medidas asépticas para la manipulación.

Después de la radiación se transportaron a un cuarto condicionado para su estadía en el bioterio, y se siguieron las reglas determinadas por el bioterio para permanecer en ese cuarto, los ratones fueron cambiados de microaislador al entrar al cuarto, y antes de manipularlos se mantuvieron mecheros de alcohol absoluto encendidos para garantizar una zona estéril, y siempre se usó bata, cofia, guantes, cubrebocas, pantalón quirúrgico y botas quirúrgicas.

Para el trasplante, la vena caudal se dilato con agua a 40 °C y la inoculación de CMN fue por esta vía, inoculando un máximo de 200 μ l/ratón.

Los ratones se mantuvieron con agua ácida pH 3 por mínimo de un mes, y se revisaron diariamente.

