

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD QUIMIOPROTECTORA DEL IMMUNEPOTENT CRP EN CÉLULAS
DE MÉDULA ÓSEA CONTRA DEL DAÑO INDUCIDO POR EL
5-FLUOROURACILO EN UN MODELO MURINO

Por:

M.C. ERIKA EVANGELINA CORONADO CERDA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN INMUNOBIOLOGIA

2016

ACTIVIDAD QUIMIOPROTECTORA DEL IMMUNEPOTENT CRP EN CÉLULAS
DE MÉDULA ÓSEA CONTRA DEL DAÑO INDUCIDO POR EL
5-FLUOROURACILO EN UN MODELO MURINO

DIRECTOR

Dr. Moisés Armides Franco Molina

Secretario

Dra. María Cristina Rodríguez Padilla

Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Vocal

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales

AGRADECIMIENTOS

A Dios

El me dio la fuerza y el ánimo para emprender y terminar este nuevo ciclo en mi vida. Todos los resultados obtenidos, las alegrías vividas y los momentos de estrés fueron dedicados a Él y a su gloria.

A mi familia

Ya que, sin ella todo esto hubiera sido difícil, siempre tuve su apoyo incondicional, y ayuda constante. A Dan por escucharme siempre y darme ánimo cada que lo necesité.

Al Dr. Moisés Franco Molina

Por su asesoría durante todo el proyecto, paciencia para introducirme a este ambiente de trabajo totalmente diferente para mí, por su apoyo y ayuda constante, gracias.

A mis compañeros del laboratorio

A todos los integrantes del L6: Yarellys, Carmen, Fernanda, Lili, Silvia, Paola, Violeta, Alex, Rilque, Pacheco, Pachequito, Martín, Luis por los momentos de risa y estrés y su ayuda en los experimentos. Chago gracias por tu paciencia cada que iba al lab5 a preguntarte todo. A todos los miembros del L5.

Al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL

Por el apoyo económico y de infraestructura para la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A Dios, le dedico el esfuerzo, desvelos, conocimiento adquirido, las experiencias vividas, los buenos recuerdos, el trabajo y los resultados de estos tres años. Este trabajo lo dedico también a mi familia, porque sin ella no hubiera llegado hasta aquí.

INDICE

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
INDICE DE TABLAS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	III
RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VI
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES.....	2
2.1 Cáncer.....	2
2.2.- Quimioterapia	3
2.2.1. Efectos secundarios de la quimioterapia.....	4
2.3. 5- Fluorouracilo.....	4
2.3.1.- 5-FU y complicaciones en médula ósea	8
2.4.- Estrés oxidativo	8
2.5 Médula ósea	11
2.5.1 Hematopoyesis	12
2.5.1.1.- Eritropoyesis	14
2.5.1.2 Granulopoyesis	15
2.5.2 Microambiente medular	16
2.6 Quimio-protectores	17
2.6.1.- N-acetilcisteína.....	20
2.7. IMMUNEPOTENT CRP	21
3.- JUSTIFICACIÓN.....	23
4.- HIPÓTESIS	24

5.- OBJETIVO GENERAL	25
5.1.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1.- Compuestos.	26
6.1.1.-Extracto dializable de leucocitos bovino.	26
6.1.2.- 5-Fluorouracilo.....	26
6.1.3.- N-acetilcisteína.....	26
6.2.- Animales experimentales.	26
6.3.- Diseño experimental.....	27
6.4.- Obtención de las células de médula ósea de ratón	27
6.5.-Conteo de células de médula ósea de ratón	28
6.6.- Evaluación de la función de las células de médula ósea de ratón.....	28
6.7.- Evaluación del ciclo celular en células de médula ósea de ratón.....	29
6.8.- Citometría de flujo	29
6.8.1.- Inmunofenotipificación de células de médula ósea de ratón	29
6.8.2.- Tinción intracelular del factor de transcripción Nrf2 en células de médula ósea de ratón	30
6.8.3.- Detección de ROS/superóxido total en células de médula ósea de ratón.....	30
6.9.- Biometrías hemáticas	31
6.9.- Cortes Histológicos.....	31
6.10.- Evaluación de ganancia o pérdida en peso corporal.....	31
6.11.- Análisis estadístico	32
7.- RESULTADOS	33
7.1.- El ICRP restaura el número y función de las células de médula ósea de ratón tratados con 5-FU.....	33
7.2.- El ICRP no afecta las fases del ciclo celular en las células de médula ósea de los ratones tratados con 5-FU.	36
7.3.- El ICRP restaura las poblaciones leucocitarias, granulocítica y eritroides en células de médula ósea de ratones tratados con 5-FU.....	37

7.4.- El ICRP disminuye la formación de ROS/Superóxido y la activación de Nrf2 inducida por 5-FU.....	41
7.5.- Cortes histológicos.....	43
7.6.- Efectos del ICRP sobre la hematotoxicidad y la ganancia de peso en los ratones tratados con 5-FU.....	44
8.- DISCUSION.....	46
9.- CONCLUSIONES	49
10.- PERSPECTIVA	50
11.- BIBLIOGRAFÍA	51
12.- RESUMEN BIOGRÁFICO	67

INDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Efecto del 5-FU, NAC+5-FU, ICRP e ICRP+5-FU en las fases del ciclo celular en médula ósea de ratón	36
Tabla 2. Efecto del 5-FU, NAC+5-FU, ICRP e ICRP+5-FU en poblaciones de origen eritroide	40
Tabla 3. Efecto del 5-FU, NAC+5-FU, ICRP e ICRP+5-FU en análisis de sangre periférica en ratones tratados	44
Tabla 4. Efecto del 5-FU, NAC+5-FU, ICRP e ICRP+5-FU en la ganancia de peso corporal de los ratones tratados	45

INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Total de muertes por cáncer en México	2
Figura 2. Historia de la quimioterapia.....	3
Figura 3. Estructura química y metabolismo del 5-Fluorouracilo.....	7
Figura 4. Esquema representativo de la hematopoyesis.....	13
Figura 5. Distribución de las poblaciones celulares analizado por citometría de flujo	14
Figura 6. Análisis por citometría de flujo de la maduración de eritroblastos...	15
Figura 7. Conteo total de células de médula ósea de ratón	33
Figura 8. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos/Monocitos	34
Figura 9. Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos/Monocitos.....	35
Figura 10. Porcentaje de Leucocitos.....	37
Figura 11. Porcentaje de Granulocitos	38
Figura 12. Porcentaje de estadios de diferenciación de eritrocitos.....	39
Figura 13. Porcentaje de formación de ROS/superóxido	41
Figura 14. Porcentaje de activación Nrf2.....	42
Figura 15. Cortes histológicos de médula ósea.....	43

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP1	Proteína Activadora 1
APC	Aloficocianina
ARN	Ácido ribonucleico
CAT	Catalasa
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
EDLb	Extracto Dializable de Leucocitos bovino
FdUMP	Fluorodeoxiuridina monofosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FUTP	Fluorouridina trifosfato
GPx	Glutación peroxidasas
HIF-1	Factor Inducible a Hipoxia 1
HO-1	Hemoxigenasa 1
ICRP	IMMUNEPOTENT CRP
IL- 1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IMDM	Medio modificado Iscove Dulbecco
Keap1	Kealch-like-erythroid cell derived protein
mL	Mililitros
NAC	N-acetilcisteína
NFκB	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
Nrf2	Factor Nuclear Eritroide-2
ON	Óxido Nítrico

PBS	Solución Salina de Fosfato
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Clorofila Peridinina
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SFB	Suero Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutasa
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
U	Unidad
UFC-GM	Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos/Monocitos
μ L	Microlitros

RESUMEN

Los tratamientos quimioterapéuticos inducen una serie de efectos secundarios, tales como neutropenia leucopenia, anemia y trombocitopenia, afectando la calidad de vida de los pacientes con cáncer. El agente 5-fluorouracilo (5-FU) es manejado en diferentes estudios como modelo de mieloablación en ratones. El extracto dializable de leucocitos bovino (EDLb) o IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) es un compuesto inmunomodulador que posee efectos antioxidantes y antiinflamatorios. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto quimioprotector del ICRP en células de médula ósea. Se realizaron ensayos de conteo total de células de médula ósea, unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos (UFC-GM), ciclo celular, inmunofenotipificación, detección de ROS, superóxido y Nrf2 por citometría de flujo, cortes histológicos y análisis hematológicos. Nuestros resultados demuestran que el ICRP aumenta el número de células de médula ósea, el número de UFC-GM, el porcentaje de leucocitos, granulocitos, y poblaciones eritroides, reduce la formación de ROS y superóxido, así como la activación de Nrf2, mejora los niveles hematológicos y aumenta el peso en ratones tratados con 5-FU. Estos resultados sugieren que el ICRP tiene un efecto quimioprotector contra el 5-FU en las células de médula ósea y puede ser utilizado en pacientes con cáncer.

ABSTRACT

Chemotherapy treatments induce a number of side effects, such as leukopenia, neutropenia, anemia and thrombocytopenia, affecting the quality of life for cancer patients. 5-Fluorouracil (5-FU) is widely used as myeloablative model in mice. The bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) or IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) is an immunomodulatory compound that has antioxidant and anti-inflammatory effects. In order to investigate the chemoprotection effect of ICRP on bone marrow cells

In 5-FU treated mice, total bone marrow (BM) cell count, bone marrow colony forming units-granulocyte/macrophage (CFU-GM), cell cycle, immunophenotypification, ROS/superoxide and Nrf2 by flow cytometry, and histological and hematological analyses were performed. Our results demonstrated that ICRP increased BM cell count and CFU-GM number, increased the percentage of leukocyte, granulocytic, and erythroid populations, reduced ROS/superoxide formation and Nrf2 activation, and also improved hematological levels and weight gain in 5-FU treated mice. These results suggest that ICRP has a chemoprotective effect against 5-FU in BM cells that can be used in cancer patients.

1.- INTRODUCCIÓN

El cáncer es considerado la segunda casusa de muerte a nivel mundial y en los últimos años se ha demostrado que el uso de altas dosis de quimioterapia mejora la tasa de sobrevivida en los pacientes, sin embargo, la calidad de vida de los pacientes es disminuida, ya que cursan con efectos secundarios como la mielosupresión, trombocitopenias, alteraciones en la coagulación, entre otros.

En la actualidad existen estudios que comprueban la protección a la médula ósea después del uso de agentes quimioterapéuticos por diferentes compuestos como L-carnitina, escualeno, derivados de plantas como la *Actinida agruta* y la *Astilbe chinensis*.

Se han descrito efectos positivos dados por extractos dializables de leucocitos humanos, en la recuperación de la hematopoyesis en ratón después de ser irradiados, por otro lado, observaciones clínicas realizadas en nuestro equipo de trabajo sustentan que pacientes bajo tratamiento quimioterapéutico junto con el extracto dializable de bovino o IMMUNEPOTENT CRP fabricado en el Laboratorio de Inmunología y Virología no cursan con los efectos secundarios dados por la quimioterapia.

Por esta razón, nos resultó de gran interés desarrollar un proyecto donde se demuestre que el IMMUNEPOTENT CRP tiene efecto protector sobre las células de médula ósea, después de ser expuestas al agente 5-Fluorouracilo.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es considerado como una enfermedad genética de células autónomas que resulta de alteraciones en oncogenes, genes supresores de tumores o estabilidad del genoma, entre otras causas (Zitvogel *et al.*, 2013).

El cáncer es un problema de salud pública (“Infocáncer. Resumen,”) siendo desde el 2008 la primera causa de muerte a nivel mundial. En México es la tercera causa de muerte y cada año se suman más de 128,000 casos nuevos (INEGI). En 2012 el número de nuevos casos de cáncer fue de 65.5 mil en hombres y de 82.4 mil casos en mujeres (“Infocáncer. Resumen,”). Estudios anteriores demuestran que el número de muertes, por cáncer en México incrementa un 2.91% por año (Aldaco-Sarvide *et al.*, 2012). En la figura 1 se muestra la principal causa de muerte por cáncer en México del 2000 al 2010.

	Porcentaje muertes 2010*	Porcentaje muertes 2000*	Lugar año 2010
Pulmón	9%	10.8%	1
Estómago	7.4%	8.6%	2
Próstata	7.3%	6.6%	5
Hígado y VB	7.2%	7.4%	4
Mama	6.8%	6%	6
Colorrectal	5.4%	4.5%	9
CaCu	5.3%	7.9%	3
Leucemias	5.3%	5.7%	7
Páncreas	4.8%	4.5%	8
LNH	2.8%	2.7%	10

FIG 1: Total de muertes por cáncer en México del año 2000 al 2010. CaCU: cervico-uterino; LNH: linfoma no Hodgkin. (aldaco-Sarvide *et al.*, 2012).

2.2.- Quimioterapia

La quimioterapia es el tratamiento de elección para los cientos de miles de pacientes de cáncer diagnosticados cada año (Carey and Burish, 1988) ya que puede tratar a gran variedad de tumores sólidos (Sudhakar, 2009) .

La cirugía y la radioterapia dominaron el campo de la terapia contra el cáncer en la década de 1960, nuevos datos mostraron que la combinación con quimioterapia disminuye el progreso de la enfermedad en pacientes con diversos tipos de cáncer (DeVita and Chu, 2008). La figura 2 muestra los avances obtenidos en el desarrollo de distintas quimioterapias y tratamientos en contra del cáncer.

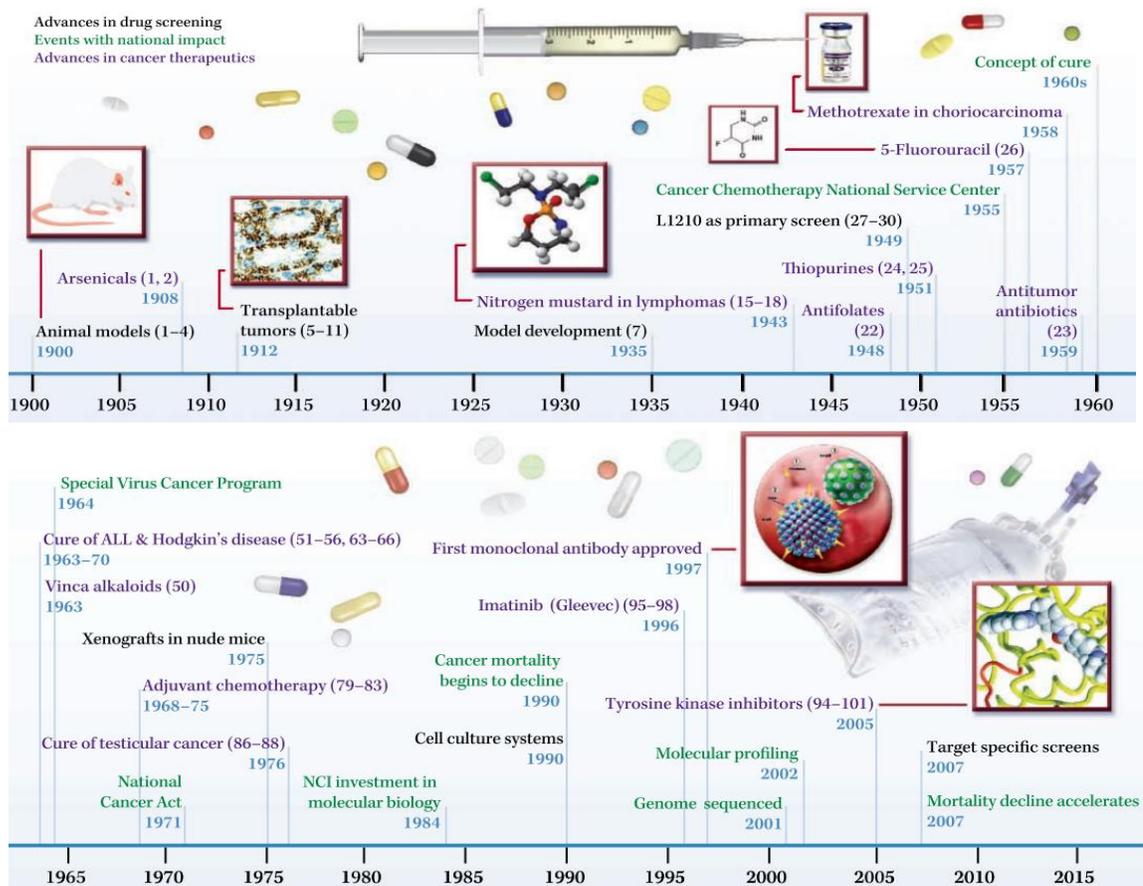


Figura 2: Historia de la quimioterapia (DeVita and Chu, 2008).

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos ejercen su función en células en división y se pueden clasificar según su toxicidad asociada al ciclo celular (ejemplo: agentes específicos de fase, específicos o no específicos del ciclo celular) o a sus mecanismos de acción (ejemplo: agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos de pirimidina) (Sarah Payne and David Miles, 2008).

2.2.1. Efectos secundarios de la quimioterapia

Lamentablemente la acción que ejerce la quimioterapia no es específica a células tumorales, teniendo como consecuencia efectos tóxicos en células normales (Sarah Payne and David Miles, 2008), resultando en efectos secundarios no deseados para el paciente (Sun and Peng, 2008).

Algunos efectos secundarios por los que padece un paciente que recibe quimioterapia son náuseas, vómitos, estomatitis, anorexia, entre otros; (Carey and Burish, 1988). Otros efectos secundarios que limitan el uso de altas dosis quimioterapéuticas son los asociados a la mielosupresión, ya que la médula ósea se ve afectada directa o indirectamente por estos agentes, por su alta tasa de proliferación (Ferreiro *et al.*, 2003; Friberg and Karlsson, 2003), estos son las neutropenias, anemias, leucopenias y linfopenias que dan como resultado una inmunosupresión sistémica afectando la calidad de vida de los pacientes (Crawford *et al.*, 2004; Groopman and Itri, 1999; Kadoyama *et al.*, 2012; Zitvogel *et al.*, 2013).

2.3. 5- Fluorouracilo

El primero en informar sobre la síntesis del 5-Fluorouracilo (5-FU) y su actividad biológica fue el equipo de trabajo del doctor Charles Heidelberger (Heidelberger *et al.*, 1957). Posee una estructura análoga al uracilo, con la sustitución de un átomo de flúor en lugar de hidrógeno en la posición C5, por lo tanto es un agente quimioterapéutico análogo de pirimidinas (Shirasaka, 2009). Se utiliza ampliamente para el tratamiento de una variedad de tumores, incluyendo colo-rectal, de mama, y los carcinomas de hígado

(Grem, 2000; Prado *et al.*, 2007; Rubbia-Brandt *et al.*, 2004; Zitvogel *et al.*, 2013). Su vida media varia de entre 8 a 22 minutos y se disemina rápidamente a médula ósea, intestino delgado, riñones e hígado (Diasio and Harris, 1989), es eliminado en su mayoría (90%) por metabolismo hepático y poco más del 5% de la droga es excretada intacta en la orina después de 24 horas (Schilsky, 1998).

Entra a la célula por transporte facilitado, y dentro de las primeras 24 horas se observa una citotoxicidad en la fase S del ciclo celular debido a los efectos sobre el DNA y después de las 24 horas, la toxicidad tiene efecto en la fase G1 (Longley *et al.*, 2003).

Para que el 5-FU ejerza su acción tóxica en células normales o tumorales debe ocurrir un proceso de anabolismo en células con actividad proliferativa, la enzima Dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) es la responsable de la reducción de la doble unión del anillo de pirimidina, después, el 5-FU es convertido en metabolitos activos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxirudina trifosfato (FdUTP) y la fluorouridina trifosfato (FUTP) (Diasio and Harris, 1989; Longley *et al.*, 2003; Schilsky, 1998; Shirasaka, 2009).

El 5-FU además inhibe la timidilato sintasa y, por lo tanto, interfiere con la síntesis del ARN y del ADN. Para incorporarse al RNA, el fluorouracilo se debe transformar en monofosfato de fluorouracilo, lo que se puede producir de dos maneras (Zitvogel *et al.*, 2013):

- a) Mediante la transferencia directa de una ribosa desde el fosforibosilpirofosfato al 5-fluoruracilo, en donde esta transferencia es catalizada por la ácido-orótico-fosforibosiltransferasa.
- b) Adición de una ribosa al 5-fluoruracilo mediante la uridina-fosforilasa para formar la fluorouridina. Seguida de una fosforilación con uridina quinasa para generar el monofosfato de fluoruracilo. Este último experimenta dos fosforilaciones secuenciales a través de la pirimidina monofosfato quinasa y pirimidina difosfato quinasa, respectivamente. El trifosfato de fluoruracilo es entonces incorporado al ARN, bloqueando la actividad del ARN y su síntesis.

Sus efectos sobre el ADN se dan cuando el fluoruracilo es transformado en fluorodeoxiuridina mediante la acción de la timidina fosforilasa y luego a fluorodeoxiuridina monofosfato a través de la timidina quinasa. Alternativamente, la fluorodeoxiuridina monofosfato puede formarse indirectamente mediante la conversión de la fluorouridina difosfato a fluorodeoxiuridina difosfato y luego a fluorodeoxiuridina monofosfato. Esta última es capaz de formar un enlace covalente, firme pero reversible con la timidilato sintasa en presencia de metilentetrahidrofolato. La unión de la fluorodeoxiuridina monofosfato a la timidina sintasa, bloquea la síntesis del timidilato a partir del uracilo. Como el timidilato es el precursor de la timidina trifosfato, uno de los cuatro desoxirribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN, su deficiencia ocasiona la depleción del trifosfato de timidina y la interrupción de la síntesis de ADN (Zitvogel *et al.*, 2013).

Además, tanto la fluorodeoxiuridina monofosfato como la fluorodeoxiuridina difosfato pueden ser convertidas a fluorodeoxiuridina trifosfato que puede ser incorporada al ADN mediante la DNA-polimerasa en lugar de la timidina trifosfato ocasionando un ADN aberrante. Todos estos eventos llevan a la muerte de la célula (Longley *et al.*, 2003). La Figura 3 muestra el anabolismo del 5-FU, así como su estructura química.

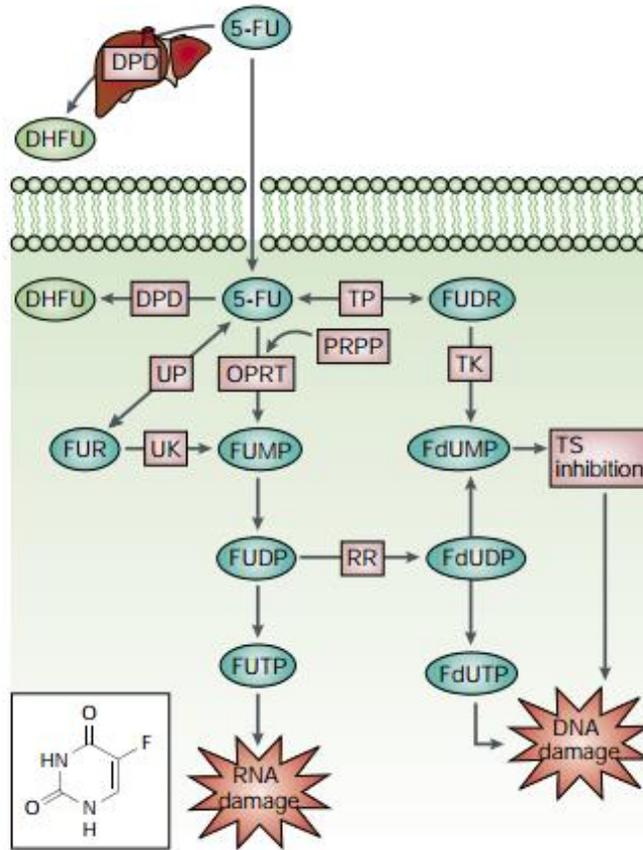


Figura 3: Estructura química y metabolismo del 5-Fluorouracilo (McWhirter *et al.*, 2013).

Otras características del 5-FU es la alteración que causa en la membrana celular al cambiar su estructura carga (Diasio and Harris, 1989), puede aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Focaccetti *et al.*, 2015), e inducir la expresión de las proteínas de choque térmico en las células tumorales para facilitar su captación por las células dendríticas y la posterior presentación cruzada de antígenos tumorales (Zitvogel *et al.*, 2013).

2.3.1.- 5-FU y complicaciones en médula ósea

Desde los años 70's se sabe que el 5-FU es capaz de causar daño significativo en las células de la médula ósea al ser altamente sensible y que su toxicidad puede ser un problema grave, que causa una morbilidad o mortalidad severa (Guest and Utrecht, 2001; Lu *et al.*, 2012; Trainor and Morley, 1976); el uso de este fármaco está asociado a, mucositis, diarrea, náuseas, erupción cutánea, vómitos, alopecia, fatiga y mielosupresión significativa; esta última reflejada en neutropenia, eritropenia periférica, trombocitopenia y leucopenia, además de eritropenia medular y granulocitopenia (S. D. Harrison *et al.*, 1978; Prado *et al.*, 2007) la expresión máxima de neutropenia se ve alrededor de los 7 a 14 días iniciando su recuperación alrededor del día 22 (Ferreiro *et al.*, 2003).

Histológicamente se observó que el uso de 5-FU (150mg/kg i.v.) en ratones, disminuye el número y tamaño de las células del compartimiento medular, afectando a las células inmaduras desde las primeras 24 horas; encontrando que la recuperación se da aproximadamente 7 días después (Radley and Scurfield, 1979), esta disminución se da tanto en células de origen mieloide y linfoide (Ramshaw *et al.*, 1995).

Dosis pequeñas de 5-FU (75mg/kg) causan mielo-toxicidad media, incrementa los niveles de hemoxigenasa (HO), disminuye las UFC e induce estrés oxidativo en células de médula ósea (Numazawa *et al.*, 2011).

2.4.- Estrés oxidativo

Como se mencionó anteriormente el 5-FU es capaz de inducir estrés oxidativo el cual es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de sistemas biológicos de detoxificar y reparar el daño resultante. Las especies reactivas de oxígeno son moléculas o iones formados por uno o más electrones no apareados de oxígeno, se producen por procesos metabólicos, e incluyen, entre otros,

a especies como el radical hidroxilo (OH), óxido nítrico (ON) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el superóxido (O_2^-) (Kasiappan and Safe, 2016; Weydert and Cullen, 2010).

El anión superóxido se forma por la reducción del oxígeno molecular en estado triple ($3O_2$); la enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte el superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (O_2), después la glutatión peroxidasa convierte al peróxido de hidrógeno en agua (Dröge, 2002).

Los niveles de ROS son formados por varios sistemas enzimáticos, entre ellos la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, enzimas del citocromo P450, lipooxigenasas y ciclooxigenasas (Kasiappan and Safe, 2016). Estos reaccionan con varios blancos intracelulares incluyendo lípidos, proteínas y ADN. El incremento de los niveles de ROS es citotóxico mientras que niveles bajos son necesarios para regular mecanismos fisiológicos incluyendo diferenciación celular, apoptosis, proliferación, adhesión celular y amplificación de la respuesta inmune (Dröge, 2002; Weydert and Cullen, 2010), dentro de los efectos citotóxicos de ROS podemos mencionar, el arresto en el ciclo celular, senescencia (Kasiappan and Safe, 2016) y muerte por apoptosis en varios tipos de células (Dröge, 2002; Yamauchi *et al.*, 2013).

Para que las especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno jueguen un papel importante en el buen funcionamiento de las células, debe de existir un balance entre ROS y los antioxidantes para que la célula se encuentre en homeostasis y para que el daño celular solo exista si presenta un aumento en estos oxidantes o una disminución en los antioxidantes; entre los factores de transcripción que se activan por ROS destacan el Factor nuclear κB (NF κB), la proteína activadora 1 (AP1), p53, Factor inducible de hipoxia (HIF-1) y los factores relacionados al Factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) (Liu *et al.*, 2005), el cual ha surgido como un regulador de resistencia celular a oxidantes (Ma, 2013).

Este factor de transcripción pertenece a un miembro de proteínas con un característico “zipper” o cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal, la región básica corriente arriba de bZip es la responsable de la unión al ADN (Fainstein, 2007). Nrf2 es expresado de manera constitutiva en todas las células, de modo que existe una proteína encargada de regula su actividad, llamada Keap 1 (Kealch-like erythroide cell-derived protein), la cual impide el paso de Nrf2 al núcleo en un 80%, al no ser activado es degradado por el proteosoma, resultando en una vida media de 20 minutos, en la mayoría de los diferentes tipos celulares (Rushworth and MacEwan, 2011).

La activación de Nrf2 es llevada a cabo por diferentes agentes tanto exógenos por ejemplo algunas quimioterapias o endógenos como las prostaglandinas, óxido nítrico (Akhdar *et al.*, 2009) o especies reactivas de oxígeno (Lindl and Jordan-Sciutto, 2008; Zucker *et al.*, 2014) y es translocado al núcleo, donde heterodimeriza con las proteínas Maf pequeñas (MafG, MafK y MafF), con las Maf grandes (c-Maf) o con otras proteínas bZIP como c-Fos, Fra1, p45-NF-E2, Bach1 y Bach2 (Fainstein, 2007). Estas proteínas se unen a la secuencia de Elementos de Respuesta Antioxidantes (ARE) para dar lugar a la activación de ciertos genes, y al metabolismo de drogas, defensas antioxidantes y señalizaciones oxidantes, después de esta activación se despliegan ciertos mecanismos de regulación, para mantener la homeostasis, como la competición de Bach1 (BTB and CNC homolog 1) por las proteínas Maf (Ma, 2013).

Algunos de los genes blanco de Nrf2 son, *Hemo-oxigenasa 1 (Ho-1)*, *Quinone-oxidoreductasa 1 (NQO1)*, *Glutamato-cisteína Ligasa (GCL)*, *Glutation S-transferasa (GST)*, *Proteínas asociadas a multidrogo resistencia (MRP)*, *Superóxido dismutasa (SOD)*, (Lindl and Jordan-Sciutto, 2008; Rushworth and MacEwan, 2011) es decir media la inducción de enzimas metabolizadoras de drogas (DMEs por sus siglas en inglés Drug metabolizing enzymes) (Ma, 2013).

En años recientes se ha descrito una “doble cara” de Nrf2 y sus genes río-abajo que cuando son sobre-expresados ya sea en muchas líneas celulares de cáncer o en tejidos de cáncer humano, incrementan la capacidad de proliferación celular incrementando la resistencia de estas células a la quimioterapia (Lau *et al.*, 2008).

2.5 Médula ósea

La médula ósea es el tejido comprendido en el centro y epífisis de los huesos; donde la sangre es producida (hematopoyesis), posee un componente hematopoyético (parénquima) y un componente vascular (estroma) (Zhao *et al.*, 2012). El estroma de la médula ósea ofrece a las células madre y a las células progenitoras un microambiente para su diferenciación (Welsch and Sobotta, 2009). La médula ósea está compuesta por diferentes tipos de células, incluyendo células sanguíneas y sus precursores, células adventicias, adipocitos y macrófagos; es la responsable de la producción de eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas, además es extensamente irrigada e inervada (Travlos, 2006).

Dentro de todos los tipos de células anteriormente mencionadas existen dos poblaciones de células madre: las células madre hematopoyéticas (HSC), que dan lugar a todos los linajes maduros de la sangre, y células madre mesenquimales (MSC), que pueden diferenciarse en hueso, cartílago y grasa (Grove *et al.*, 2004; Short and Wagey, 2013). Las células madre se definen como células que tienen la capacidad de perpetuarse a través de la auto-renovación y generar células maduras de un tejido particular a través de la diferenciación (Grove *et al.*, 2004; Hall and Watt, 1989; Reya *et al.*, 2001).

La médula ósea es capaz de producir alrededor de 3 mil millones de eritrocitos, 2.5 millones de plaquetas y 1.5 mil millones de granulocitos por kilogramo de peso corporal cada día por medio de la hematopoyesis (Rodak, 2005).

2.5.1 Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso por el cual madura la progenie funcional de los ocho principales linajes de células de la sangre; se producen a partir de una jerarquía de progenitora progresivamente menos madura y de células madres (Alexander, 1998) y se limita a ciertas regiones en el adulto, como las vértebras, costillas, esternón y las epífisis proximales del húmero y de fémur (Welsch and Sobotta, 2009). Distintos componentes del estroma medular juegan un papel importante en la regulación de esta (Castro-Malaspina *et al.*, 1980).

La hematopoyesis es un proceso continuo, pero puede ser dividida en diferentes fases (Travlos, 2006):

1. La primera involucra células madre pluripotentes, las cuales tienen la propiedad de auto-renovación y diferenciación. Estas células pueden dar origen a todo tipo de células hematopoyéticas (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas).
2. La segunda se da cuando las células poseen una limitada capacidad de auto-renovación y una alta capacidad de diferenciación y de desarrollar células maduras, estas células son multipotentes y son capaces de formar colonias de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos o basófilos), eritrocitos, monocitos y megacariocitos (UFC-GEMM).
3. La tercera fase ocurre cuando las células madre comprometidas se diferencian hacia células progenitoras de linaje específico bajo la influencia de factores de crecimiento. Estas células progenitoras son capaces de dar lugar a unidades formadoras de colonias de megacariocitos (UFC-Meg), unidades de estadillo eritroide (BFE-E) o unidades formadoras de colonias de granulocitos y monocitos (UFC-GM). Estas células progenitoras se convierten en células precursoras o “blastos” y posteriormente, son formadas las células que circularán en sangre (Figura 4).

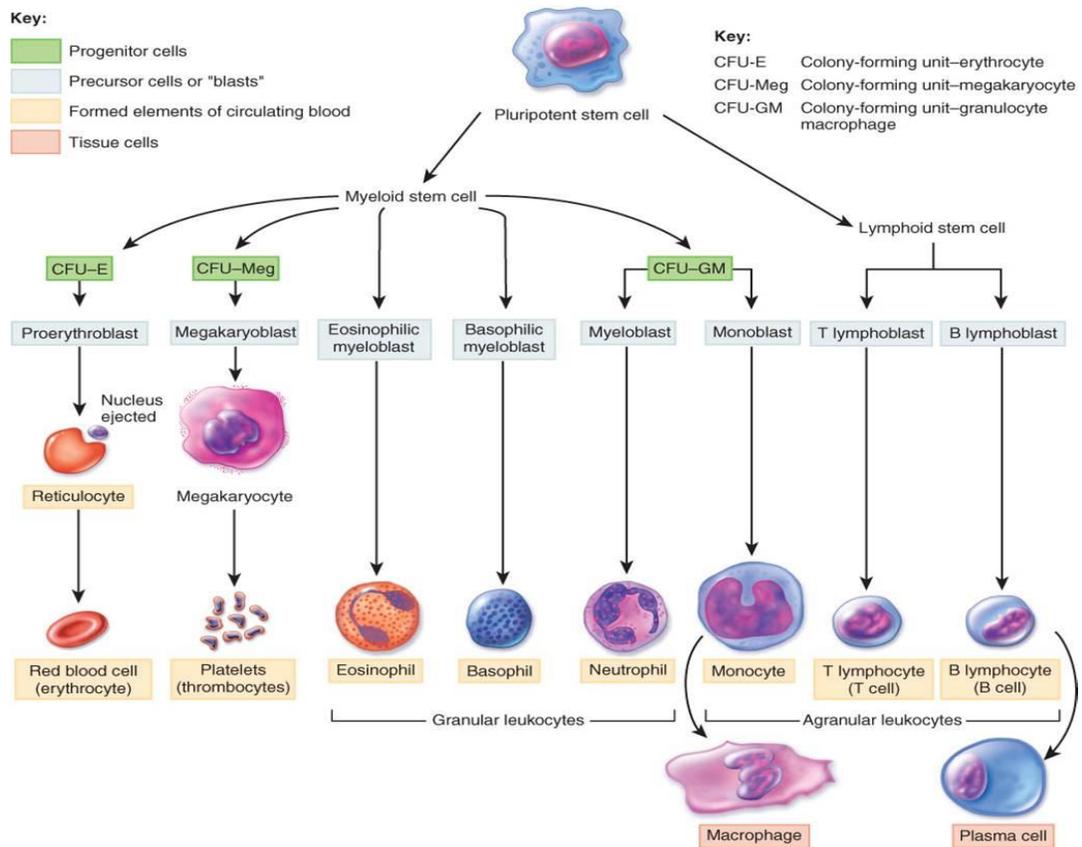


Figura 4: Esquema representativo de la hematopoyesis (Travlos, 2006).

La cuantificación de unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (UFC-GM) y las unidades formadoras de eritroides (BFU-E) mediante el cultivo a corto plazo en medios semisólidos, proporciona información sobre el compromiso del linaje y potencial proliferativo de la médula ósea (Sheikhzadeh *et al.*, 2001).

De las células que son totalmente maduras aproximadamente, un 62.63% son leucocitos $CD45^+$ y un 37.8% de células $CD45^-$ o eritroblastos (Pösel *et al.*, 2012), un 8-20% de las células mononucleares son linfocitos y un 20-30% son células mieloides o granulocitos con un fenotipo $Gr-1^+ - CD11b^+$ (Francke *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012), (Fig5).

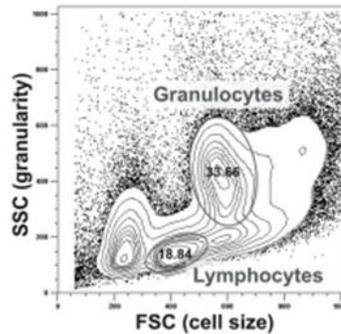


Figura 5: Distribución de las poblaciones celulares analizado por citometría de flujo (Francke *et al.*, 2011).

2.5.1.1.- Eritropoyesis

La eritropoyesis es la formación de eritrocitos y ocurre en unidades anatómicas dentro de la médula ósea llamadas islas eritroblásticas (Travlos, 2006). Se han identificado varias etapas de diferenciación de las células eritroides, las cuales proceden de progenitores eritroides (BFU-E), que son diferenciadas a proeritroblasto, subsecuentemente a eritroblasto basófilo, policromáticos y a eritroblasto ortocromático, finalmente la célula es diferenciada a eritrocito maduro (Ripich and Jessberger, 2011; Socolovsky *et al.*, 2001).

El marcador de superficie específico de linaje eritroide, Terr 119, es expresado en los precursores subsecuentes al proeritroblasto, igualmente el marcador CD71 es expresado en etapas tempranas de los precursores eritroides principalmente en proeritroblastos y eritroblastos basófilos tempranos (Socolovsky *et al.*, 2001), con la ayuda de estos marcadores y la citometría de flujo se pueden identificar las diferentes etapas de maduración; región I representa a proeritroblastos (Terr119^{bajo}CD71^{alto}), región II eritroblastos basófilos (Terr119^{alto}CD71^{alto}), región III eritroblastos policromáticos (Terr119^{alto}CD71^{medio}) y la región IV de eritrocitos ortocromáticos y eritrocitos maduros (Terr119^{alto}CD71^{bajo}) (Fig6) (Leung *et al.*, 2007; Srinoun *et al.*, 2009).

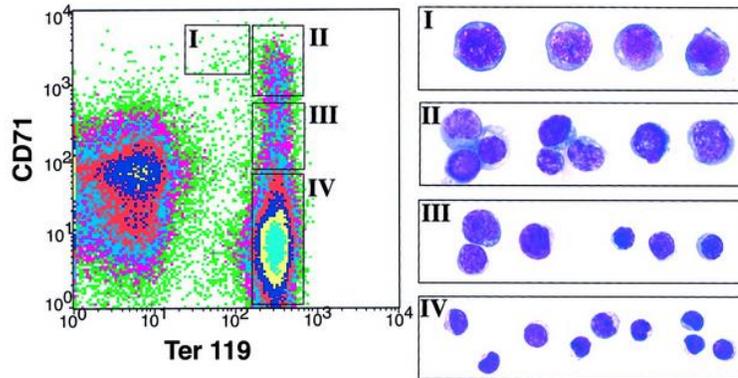


Figura 6: Análisis por citometría de flujo de la maduración de eritroblastos. Regiones de identificación del proceso de maduración eritroide: región I representa a proeritroblastos, región II eritroblastos basófilicos, región III eritroblastos policromáticos y la región IV eritroblasto ortocromático

2.5.1.2 Granulopoyesis

La granulopoyesis consiste en el proceso que permite la generación de los neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Se genera a partir de la línea mieloide. Las células progenitoras de granulocitos-monocitos (UFC-GM) son las células destinadas a convertirse en neutrófilos o macrófagos. Estas células pasan de un estado progenitor a un estado precursor de monoblastos (UFC-M) o mieloblastos (UFC-G), estas últimas son neutrófilos primitivos y se pueden ser diferenciados morfológicamente (Kozutsumi, 1996).

A partir de este mieloblasto, se diferencia en promielocito después a mielocito el cual se convertirá en metamielocito basófilo, acidófilo o neutrófilo (Manascero-G., 2003).

Como se mencionó anteriormente los granulocitos poseen un fenotipo $CD11b^+Gr1^+$. Morfológicamente las células $CD11^{alto} Gr1^{bajo}$ consisten en células con núcleo en forma de anillo y poca condensación central característica de granulocitos inmaduros (bandas), por otro lado, la población $CD11^{alto} Gr1^{alto}$ son de núcleo más condensado y con acumulación de gránulos citoplasmáticos, típico de granulocitos maduros (Yang *et al.*, 2011).

La médula ósea forma aproximadamente $1-2 \times 10^{11}$ de neutrófilos al día, y estos salen rápidamente de la médula ósea cuando existe una infección o algún tipo de estrés (Zhao *et al.*, 2012).

2.5.2 Microambiente medular

El control de la hematopoyesis implica interacciones celulares íntimas entre el desarrollo de células sanguíneas y elementos estromales así como la regulación de las citoquinas solubles, que pueden actuar a nivel local en el entorno de la médula ósea o en lugar del tejido remoto (Alexander, 1998a).

En la médula ósea existen factores ambientales que son esenciales para regular la latencia de las HCS en el adulto como la quimosina CXCL12/SDF-1, el factor de células madre (SCF), la angio-eritropoyetina-1 (Ang-1), interleucina 3 (IL-3) y la trombopoyetina (TPO) (Gothot *et al.*, 1998; Ladd *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2009).

El SCF, es codificado por el gen *Sf*, es una proteína que se une al receptor de c-kit, está presente en forma soluble y transmembranal, resultado de un splicing alternativo. El SCF promueve la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas, y lo producen diferentes tipos de células como los fibroblastos (Ikuta *et al.*, 1992). El SCF y c-kit tienen un papel importante en la megacariopoyésis e interactúa con otras citocinas para promover las células madre linfoides y mielo-eritroides, además son conocidos como los principales estimuladores hematopoyéticos en la quimioterapia o en mielo-supresión inducida por radiación (Raghavendran *et al.*, 2012).

La IL-3 actúa como una señal para estimular la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas, acelera la recuperación de las plaquetas circulantes, neutrófilos y monocitos y reduce algunos agentes quimioterapéuticos (Alexander, 1998b; S. D. J. Harrison *et al.*, 1978; Raghavendran *et al.*, 2012). Se ha observado que

mejora en un 77% el recuento absoluto de neutrófilos y en un 33% el recuento de plaquetas en pacientes bajo quimioterapia (Nand *et al.*, 1994).

La interleucina 6 (IL-6) puede promover o inhibir el crecimiento de células tumorales, dependiendo del tipo de célula. Actúa en concierto con IL-3 para inducir a los progenitores pluripotentes de bazo murino y con el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) para estimular el número y tamaño de las unidades formadoras de colonias de macrófagos (UFC-M) (Ikebuchi *et al.*, 1987).

La interleucina 1 (IL-1) es uno de los factores principales en el mecanismo de defensa biológica que mejora la restauración de las células madre y de las subpoblaciones progenitoras en la médula ósea murina, además acelera la recuperación hematopoyética en ratones con mielosupresión inducida por quimioterapia (Dinarello, 1989).

La interleucina 12 (IL-12) y la IL-1 estimulan los precursores de células de la médula ósea muestran actividades quimio protectoras, promueven el ciclo células de los precursores celulares (Dalmau *et al.*, 1997).

El factor de crecimiento tumoral- β (TGF- β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) son conocidos por su capacidad de detener el ciclo celular de las células hematopoyéticas primitivas (Copley *et al.*, 2012; Dalmau *et al.*, 1997; Guest and Utrecht, 2001). El TNF es un potente inhibidor de la eritropoyesis que suprime el crecimiento de progenitores eritroides y mieloides *in vitro* e inhibe significativamente el crecimiento de las BFU-E (Gd *et al.*, 1987).

2.6 Quimio-protectores

Se han realizado grandes esfuerzos relacionados al tratamiento de las reacciones secundarias derivadas del efecto de la quimioterapia. Desde los 80's se sabe que el péptido hemato-regulador pEEDCK (PyroGlu-Glu-Asp-Cys-Lys) que fue purificado a

partir de los granulocitos humanos maduros reduce la duración de neutropenia inducida por arabinofuranosilciteína (Ara-C) (Paukovits and Laerum, 1982). En años posteriores se demostró que además aumenta el rendimiento de las UFC-GM después del tratamiento con 5-FU (Paukovits and Paukovits, 1995).

Ciertos factores de crecimiento y citocinas como el G-CSF y la IL-1 aceleran la recuperación de las células madre y neutrófilos de sangre periférica tras la administración del 5-FU a ratones, acompañado de la regeneración de UFC-GM (Moore and Warren, 1987).

Otro protector endógeno es el AcSDKP (ácido-lisina-prolina) que ha demostrado aminorar la toxicidad hematopoyética y ofrecer una protección contra las dosis letales del 5-FU, además protege a los ratones de la toxicidad hematológica debido a la quimioterapia (Comte *et al.*, 1998).

Una dosis de 154 mg/kg de amifostie (ETHYOL ®) previos a la inyección de 200mg/kg de ciclofosfamida en un modelo murino produjo una protección de los progenitores eritroides de la médula ósea, esto fue demostrado por el aumento en las CFU-E (Aguirre *et al.*, 2000).

Hablando de compuestos naturales, la catequina (+) aislada de la planta *Actinidia arguta* aceleró la recuperación en la cantidad de glóbulos blancos y plaquetas en los ratones tratados con 5-FU, mediante citometría de flujo se comprobó que la catequina (+) revirtió la supresión de población leucocitaria, monocítica y granulocítica siendo más selectiva la recuperación con esta población (Takano *et al.*, 2004).

El equipo de Abd-Allah comprobó que la L-Carnitina detiene la apoptosis inducida por el carboplatino y mejora la función de los progenitores de la médula ósea, al aumentar el número de UFC en respuesta a los GM-CSF (Abd-Allah *et al.*, 2005).

El escualeno reduce significativamente la pérdida de peso inducida por el cisplatino y el carboplatino en un modelo murino, al aumentar el número de UFC hematopoyéticas, al reducir las especies reactivas de oxígeno e incrementar los niveles de glutatión S-transferasa (Das *et al.*, 2008).

En el 2008 se puso a prueba la actividad protectora de la planta *Astilbe chinensis*, en contra de la citotoxicidad inducida por ciclofosfamida en un modelo murino y se observó un aumento significativo en el número de células medulares, y en el conteo de células blancas periféricas (Sun and Peng, 2008).

Uno de los estudios más actuales demostró que el *Panax ginseng* mejora significativamente la mielopoyesis *in vitro* y reconstituye la médula ósea de ratón después de la mielosupresión inducida por el 5-FU, mejora el conteo de células blancas, linfocitos, neutrófilos y glóbulos rojos en sangre, así como el peso del bazo y del timo (Raghavendran *et al.*, 2012).

Se estudió el efecto de la dopamina en ratones tratados con 5-FU (20 mg/kg diario por 5 días) obteniendo resultados favorables al aumentar el número de UFC-GM y no tener efectos adversos (Sarkar *et al.*, 2015).

Existen compuestos que proponen su actividad protectora mediante la captación de radicales libres como lo son la melatonina, la dimetiltiourea y el N- acetilcisteína (NAC) después del tratamiento con ciclofosfamida o carmustina al aumentar la actividad de enzimas antioxidantes en células de médula ósea (El-Sayed *et al.*, 2011, 2010; Shokrzadeh *et al.*, 2014).

2.6.1.- N-acetilcisteína

El N-acetilcisteína es un aminotiol y precursor sintético de cisteína intracelular y glutatión; por lo tanto se considera un importante antioxidante (Sun, 2010). En plasma NAC puede estar presente en su forma intacta, reducida o en diversas formas oxidadas; es oxidado a disulfuro y también puede formar disulfuros mixtos al reaccionar con otros tioles de bajo peso molecular, tales como cisteína y glutatión (Olsson *et al.*, 1988). Es usado desde hace años como agente mucolítico en enfermedades respiratorias crónicas, así como antídoto a la sobredosis de acetaminofén, recientemente es utilizado en tratamiento de enfermedades cardíacas, infecciones por VIH, toxicidad por metales y daño oxidativo (Rushworth and Megson, 2014).

El NAC puede normalizar el estrés causado por agentes oxidativos mediante diferentes vías de señalización o activando proteínas como MAP quinasas, S-Fos y NF- κ B; además los grupos sulfhidrilos en la molécula de NAC actúa como captador de superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Radomska-Lesniewska and Skopinski, 2012).

Debido a estas propiedades antioxidantes se han realizado distintos estudios para dilucidar si el NAC es antagonista o potenciador de los agentes quimioterapéuticos; por ejemplo, se sabe que el NAC protege a células leucémicas de una muerte por apoptosis producida por los compuestos CDODO-Me-12 y CDODO-Me-11, ya que bloquea todas las actividades biológicas de los compuestos (Sun, 2010). De igual manera inhibe el efecto antiproliferativo del compuesto sintético ácido metil-selenico y de la droga MG132 en células de cáncer de pulmón (Han and Park, 2009; Liu *et al.*, 2004). De manera contraria otros estudios han encontrado que el NAC ejerce un efecto sinérgico en conjunto con doxorubicina para inhibir la proliferación en la línea de cáncer de mama MDA-MB-435 (Radomska-Lesniewska and Skopinski, 2012).

2.7. IMMUNEPOTENT CRP

EL IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) es un extracto dializable de una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular liberados por los leucocitos de sangre desintegrados o de tejido linfoide homogeneizado obtenido de bazo bovino. Este extracto dializable de leucocitos (EDL) contiene diferentes componentes y se ha demostrado que varios de ellos son capaces de modificar la respuesta del sistema inmune, moléculas de un tamaño menor a 3,500 Da (Franco-Molina *et al.*, 2005, 2004; Mendoza-Gamboa *et al.*, 2006).

Nuestro equipo de trabajo ha demostrado diferentes actividades inmunomoduladoras del ICRP tanto *in vitro* como *in vivo*, desde disminuir la producción de TNF- α e IL-6 y de aumentar la producción de IL-10 después de ser utilizado como tratamiento, en macrófagos peritoneales murinos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) (Franco-Molina *et al.*, 2005), modular la expresión de mRNA de algunas citocinas pro-inflamatorias en células sanguíneas humanas estimuladas con LPS, así como la producción de estas mismas (TNF- α , IL-6) sin afectar la viabilidad de las células sanguíneas (Franco-Molina *et al.*, 2007), así como disminución del óxido nítrico (ON) y TNF- α , también incrementa moléculas antioxidantes y disminuye la fosforilación de I κ B y la unión de NF- κ B al DNA. Las características del ICRP para modular moléculas oxidantes e inflamatorias es de mayor importancia ya que estos metabolitos son potentes mediadores pro-inflamatorios. El tratamiento con este compuesto disminuye las moléculas mencionadas anteriormente incrementando la actividad antioxidante intracelular de catalasas (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y súper óxido dismutasa (SOD) estas secuestran, reparan y previenen el daño causado por los radicales libres como el óxido nítrico (ON), prostaglandinas (PGs) y cicloxigenasa-2 (COX-2) (Moisés A. Franco-Molina, 2011).

Otros equipos de trabajo han observado que el extracto dializable de leucocitos es capaz de estimular la formación de BFU-E bajo la influencia de eritropoyetina e incrementa el

número de la formación UFC-GM *in vitro*, debido a la cooperación entre los factores de crecimiento y el EDL (Barnet *et al.*, 1996).

Por si solo el EDL no mejora el crecimiento y el número de colonias pero al ser administrado en conjunto con factores estimulantes de colonias se observó una mejoría en el número de las mismas en comparación a los ratones tratados solo con factores de crecimiento (Vacek *et al.*, 1997).

Además este mejora la recuperación de las células madre hematopoyéticas y de progenitores hematopoyéticos de granulocitos y macrófagos *in vivo* e incrementa el número de leucocitos en la sangre periférica de ratones expuestos a rayos gamma (Vacek *et al.*, 2000).

3.- JUSTIFICACIÓN

La supresión de la producción medular de células sanguíneas es una complicación común del tratamiento quimioterapéutico, siendo esto una causa de la disminución en la calidad de vida de los pacientes que reciben estos tratamientos.

Una droga ampliamente utilizada en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, es el 5-FU, un antimetabolito que ejerce efecto citotóxico por medio de la inhibición de la timidilato sintasa, siendo particularmente tóxico sobre tejidos de alta proliferación incluyendo el neoplásico y médula ósea.

En la actualidad existen pocos compuestos que ayuden a mejorar la calidad de vida de los pacientes que reciben quimioterapia, es por eso importante la búsqueda de nuevas alternativas que disminuyan o protejan a los pacientes de los efectos secundarios de estos agentes.

4.- HIPÓTESIS

El IMMUNEPOTENT CRP es capaz de proteger a la médula ósea de la citotoxicidad inducida por el agente quimioterapéutico 5-Fluorouracilo en un modelo murino.

5.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la protección inducida por el IMMUNEPOTENT CRP en médula ósea tras la aplicación de 5-Fluorouracilo en un modelo murino.

5.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto en el número y función de las células de médula ósea en los ratones tratados con 5-Fu y/o ICRP.
2. Evaluar el ciclo celular de las células de médula ósea en ratones tratados con 5-FU y/o ICRP.
3. Evaluar la protección de los linajes mieloides y eritroides de los ratones tratados con 5-FU y/o ICRP.
4. Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno y activación del factor de transcripción Nrf2.
5. Comparar los cortes histológicos de médula ósea de los ratones tratados con 5-FU y/o ICRP.
6. Comparar los valores de biometrías hemáticas en ratones tratados con 5-FU y/o ICRP.
7. Evaluación de la ganancia o pérdida de peso corporal en ratones tratados con 5-Fu y/o ICRP.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Compuestos.

6.1.1.-Extracto dializable de leucocitos bovino.

El Extracto Dializable de Leucocitos Bovino, producido en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL; es una mezcla de sustancias de bajo peso molecular (de corte de 10-12 kDa) liberadas de la diálisis de bazo desintegrados de bovino. El EDLb es obtenido a partir de 15×10^8 leucocitos y se define como una unidad 1 (U) (Franco-Molina *et al.*, 2007). Este producto se encuentra registrado bajo el nombre comercial de IMMUNEPOTENT CRP.

6.1.2.- 5-Fluorouracilo.

Se empleó 5-FU (FLUOROURACILO SOLUCION INYECTABLE 250 mg/5 mL 5 frascos ampula, TEVA MEXICO) como agente quimioterapéutico. Distintos estudios lo han utilizado para ejercer toxicidad a la médula ósea (Comte *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2012; Moore and Warren, 1987; Paukovits and Paukovits, 1995; Raghavendran *et al.*, 2012; Takano *et al.*, 2004).

6.1.3.- N-acetilcisteína.

Es un precursor antioxidante del glutatión (Y-glutamilcisteinglicina, GHS). Frasco granulado con 3 gr de acetilcisteína (Solución 100mg/5mL, SANDOZ, S.A. de C.V.).

6.2.- Animales experimentales.

Ratones BALB/c de 6-8 semanas, fueron alimentados *ad libitum* con dieta balanceada para ratón (Harlan Teklan), a una temperatura ambiente de 25°C (± 1). Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo las reglas del Comité de Bioética Animal del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.3.- Diseño experimental

Los ratones fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos los cuales recibieron diferentes tratamientos. El día 0 se tomó como el día en que se empezó con el esquema de tratamientos y las evaluaciones se realizaron el día 1 y 7 post-quimioterapia. A continuación, se describe el diseño experimental del presente estudio.

Grupo control: se administró agua inyectable vía i.p (día 0) e i.m. (por 6 días consecutivos).

Grupo 5-FU: se administraron 75mg/kg de 5-FU vía i.p.

Grupo NAC+5-FU: este grupo sirvió como control positivo de protección. Se administraron 250mg/kg de N-acetilcisteína vía i.p. 1 hora antes de la administración del 5-FU a 75 mg/kg (Numazawa *et al.*, 2011).

Grupo ICRP: se administraron 5U de ICRP i.m. 1 hora antes de la administración de solución salina que se administró vía i.p. en el día 0, posteriormente se continuó con la administración de 5U de ICRP cada 4 horas. Los días del 1 al 6 se administraron 5U de ICRP vía i.m.

Grupo ICRP+5FU: En el día 0, se administraron 5U de ICRP i.m. 1 hora antes de la administración del 5FU (75 mg/kg) y se continuó con la administración de 5U de ICRP cada 4 horas. Los días del 1 al 6 se administraron 5U vía i.m.

6.4.- Obtención de las células de médula ósea de ratón

Para los ensayos de evaluación del número, función, ciclo celular, marcadores de superficie; se obtuvieron las células de médula ósea de ratón. Para lo cual, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, se realizó la disección de ambos fémur y tibias, se limpió el exceso de tejido muscular y ligamentoso, posteriormente se obtuvieron las células de médula ósea realizando cinco lavados por el extremo de cada hueso (4 por ratón), insertando una jeringa de insulina (1mL) cargadas con medio IMDM conteniendo 2% de suero fetal bovino (FBS). La suspensión celular se centrifugó

(1200 rpm/10 min), se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de medio IMDM conteniendo 2% de SFB, hasta su empleo (Nadri *et al.*, 2007).

6.5.-Conteo de células de médula ósea de ratón

Una vez recolectadas las células de médula ósea, se realizó un conteo, mediante la técnica de azul tripan, la cual nos ayuda a excluir células muertas de células viables. Para el cálculo de las células obtenidas para cada ratón, se tomaron 50 μ L de la suspensión celular, posteriormente fueron agregadas a 400 μ L de medio IMDM, más 5 μ L de azul tripan, de esta suspensión se tomaron 10 μ L y se colocaron en la cámara de Neubauer (Bright Line, Reichert, USA), se realizó la observación bajo microscopio (Axiovert25, Zeiss) a 10X y se contaron las células viables presentes en los cuadrantes, obtenido este total se realizó un promedio y el resultado se divide entre el factor de dilución (10) para así obtener el número total de células por mL de medio.

6.6.- Evaluación de la función de las células de médula ósea de ratón

La función de las células de médula ósea fue evaluada por la formación de colonias de granulocitos y monocitos (UFC-GM) utilizando medio completo de metilcelulosa (R & D System), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un total de 1×10^5 células de médula ósea fueron resuspendidas en 1 mL de medio IMDM conteniendo 2% de SFB (Stock 10x), de esta suspensión se tomaron 300 μ L y se añadieron a 3 mL de medio completo de metilcelulosa, se colocó en vortex a máxima velocidad por 5 segundos. Posteriormente con una jeringa de 3mL se recolecto el medio junto con las células y se colocaron 1.1 mL de la mezcla final en una placa de 35 mm cuadrículada (duplicado). Estas placas fueron incubadas junto con una tercera placa con 3 mL de agua estéril dentro de una caja de cultivo de 100 mm, se incubaron durante 12 días en una atmósfera a 37°C y 5% de CO₂. Después del tiempo de incubación se contó el número total de colonias formadas empleando un microscopio invertido (Das *et al.*, 2008; Kawakatsu *et al.*, 2013).

6.7.- Evaluación del ciclo celular en células de médula ósea de ratón

Para evaluar el ciclo celular se utilizó el kit BD Cycletest Plus DNA reagent (BD Biosciences, CA, USA), el cual nos permite analizar el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular (SubG0, G0/G1, S, M,) mediante citometría de flujo.

1×10^6 células de médula ósea de ratón, fueron lavados 3 veces con 1 mL de solución de buffer, después del último lavado se retiró el sobrenadante y al pellet se le agregaron 250 μ L de solución A (solución de tripsina), se dejó incubar por 10 minutos, en seguida sin retirar la solución A, se agregaron 200 μ L de la solución B (inhibidor de tripsina), se dejó incubar por diez minutos a temperatura ambiente, por último se agregaron 200 μ L de solución C (2 a 8°C) (tinción de yoduro de propidio) por diez minutos a 4°C. Después del tiempo de incubación la muestra fue adquirida en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences, CA, USA) adquiriendo un total de 10,00 eventos por muestra, y se analizó con el programa FlowJo X 10.0.7 (Tree Star, San Carlos, CA).

6.8.- Citometría de flujo

6.8.1.- Inmunofenotipificación de células de médula ósea de ratón

Para el análisis de inmunofenotipificación de las células de médula ósea de ratón, estas se tiñeron utilizando anticuerpos anti-CD45 conjugado con PerCP, anti-CD11b conjugado con APC, antiGr-1 conjugado con PE, anti-CD71 conjugado con FITC y anti-Terr119 conjugado con APC (BD Biosciences, San José, CA.). Se analizaron 3 poblaciones celulares: leucocitos totales con el anticuerpo CD45, granulocitos con los anticuerpos CD11b y Gr-1 y la población eritroide con los anticuerpos CD71 y Terr119. De la suspensión celular antes obtenida se ajustaron para cada población 1×10^6 células, resuspendiendo el pellet en 100 μ L de PBS y 5 μ L de cada anticuerpo, se dejaron 30 min en incubación a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las muestras a 1200 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 μ L de PBS al 5% de albúmina sérica bovina (BSA), se repitió este paso, para finalizar el pellet se resuspendió en 100 μ L de PBS. Las células viables fueron

analizadas en el citómetro de flujo Accuri C6 con el software CFlow plus (BD Biosciences, San José, CA.).

6.8.2.- Tinción intracelular del factor de transcripción Nrf2 en células de médula ósea de ratón

Para la tinción intracelular de Nrf2 se utilizó el anticuerpo NRF2 (D1Z9C) XP[®] de conejo conjugado con PE. Se prepararon los siguientes reactivos PBS al 1X, formaldehído al 16% y buffer de incubación el cual consta de PBS 1X con 5% de BSA. Para la fijación de las células, 1×10^6 células fueron recolectadas en tubos eppendorf de 2 mL y el pellet fue resuspendido en formaldehído al 4%, se incubaron por 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se colocaron en hielo por un minuto. Para la permeabilización, se removió la solución fijadora de las células y se resuspendió el pellet en metanol al 90% y fueron incubadas por 30 minutos en hielo. Por último, se procedió a la tinción nuclear, lo cual consiste en retirar el metanol agregando 1 mL de buffer de incubación a cada tubo y lavar dos veces mediante centrifugación, luego se adicionaron al pellet celular 100 μ L de la preparación del anticuerpo Nrf2-PE (dilución 1:50), e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz. Posteriormente se lavaron por centrifugación en 1 mL de buffer de incubación y el pellet se resuspendió en 500 μ L de PBS para su análisis en el citómetro de flujo Accuri C6 con el software CFlow plus (BD Biosciences, San José, CA.).

6.8.3.- Detección de ROS/superóxido total en células de médula ósea de ratón

Fue utilizado el kit de detección total de ROS-ID[™]. Se reconstituyó el reactivo de detección de estrés oxidativo y el reactivo de detección de superóxido con 60 μ L de dimetilformamida anhídrida, se preparó el wash buffer de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para analizar la muestra, se preparó la solución de detección de

ROS/superóxido (2x), mezclando 10 mL de wash buffer con 4 µL de reactivo de detección de estrés oxidativo más 4 µL de reactivo de detección de superóxido. Se agregó 100 µL de esta solución a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 1×10^6 células de cada ratón tratado, se dejó incubar por 30 minutos, pasado el tiempo de incubación se analizaron las muestras en el citómetro de flujo Accuri C6 con el software CFlow plus (BD Biosciences, San José, CA.).

6.9.- Biometrías hemáticas

La toma de muestra se realizó por punción cardíaca, la muestra fue puesta en viales con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron analizadas en un hematocitómetro automático (COULTER® Ac-T diff™ Analyzer, Beckman Coulter) para el conteo de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, conteo de glóbulos blancos y plaquetas.

6.9.- Cortes Histológicos

El fémur derecho de cada ratón fue colocado en formol al 10% amortiguado, posteriormente fue fijado, descalcificado, seccionado (4 µm de espesor) y teñido con hematoxilina y eosina. El análisis histopatológico fue determinado por un patólogo veterinario.

6.10.- Evaluación de ganancia o pérdida en peso corporal

El peso fue calculado en gramos mediante el uso de una balanza analítica, se realizó el registro el día 0 y 7. La diferencia de peso se realizó mediante la resta del peso final (día 7) menos peso inicial (día 0).

6.11.- Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedio \pm desviación estándar y fueron analizados estadísticamente con la prueba de ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey para la comparación de medias. $P < .05$ ($n=3$) utilizando el programa estadístico SPSS v17.

7.- RESULTADOS

7.1.- El ICRP restaura el número y función de las células de médula ósea de ratón tratados con 5-FU.

La evaluación del número de células de médula ósea de ratón fue realizada al día 1 y 7 después de iniciar el tratamiento. El número total de células fue disminuido significativamente ($P < 0.05$) en los grupos 5-FU, NAC+5-FU e ICRP+5-FU en el día 1 con respecto al control. En el día 7 no existió diferencia en el número de células entre el grupo control y los grupos NAC+5-FU e ICRP+5-FU ($P < 0.05$). No se observó diferencia significativa entre el grupo de ICRP con respecto al control al día 1 y 7 (Figura 7).

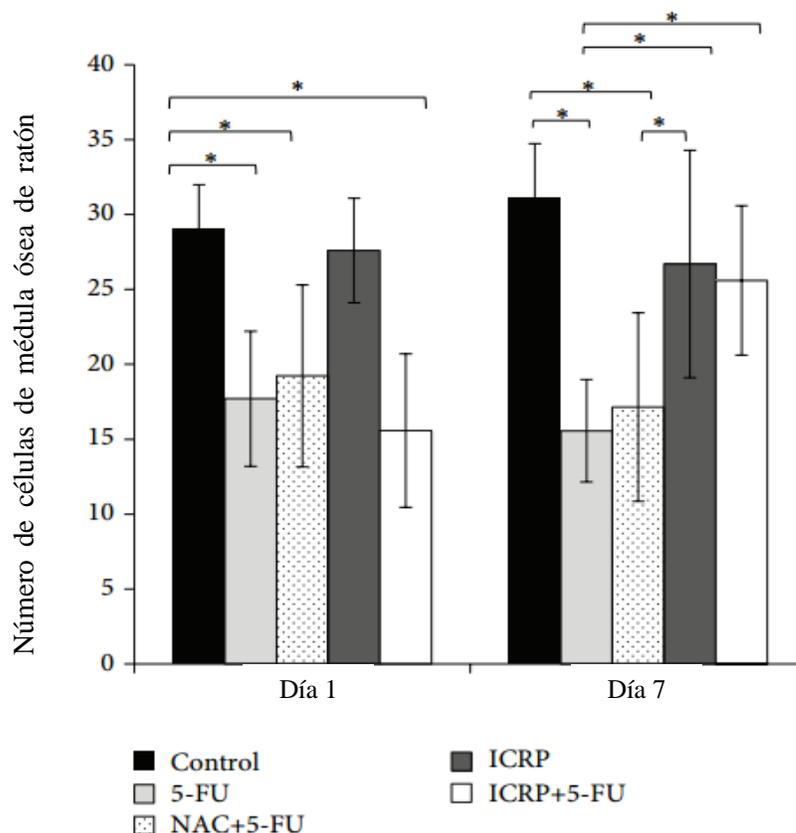


Figura 7. Conteo total de células de médula ósea de ratón: células de médula ósea de ambos fémures y tibias fueron obtenidas en el día 1 y 7 de los ratones tratados. Subsecuentemente, las células fueron contadas por la técnica de exclusión azul tripan. $*(P < 0.05)$ (n=3).

En la evaluación de la función de células de médula ósea de los ratones tratados, se observó que los grupos NAC+5-FU e ICRP+5-FU no sufrieron el mismo daño en la función celular que el grupo 5-FU en el día 1. En el día 7 los grupos NAC+5-FU e ICRP+5-FU aumentaron el número de UFC-GM comparados con el control (Figura 8).

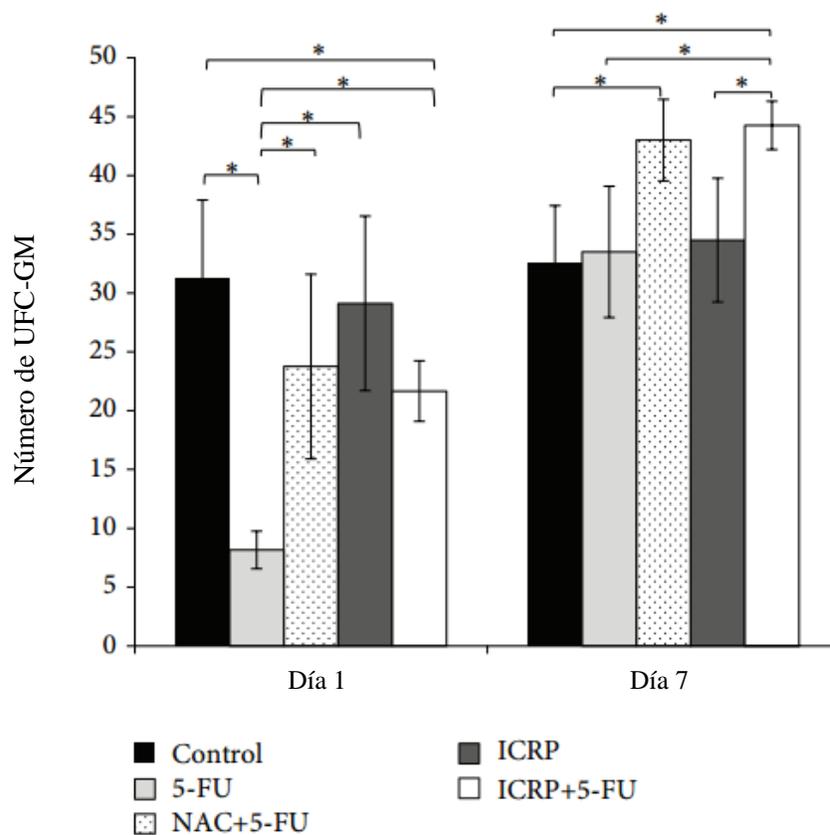


Figura 8. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias Granulocitos/Monocitos (UFC-GM): células de médula ósea de ambos fémures y tibias fueron obtenidas en el día 1 y 7 de los ratones tratados. Posteriormente las células fueron cultivadas en medio completo de metilcelulosa al 5% de CO₂, fueron incubadas por 14 días y se contaron las colonias en microscopio invertido. *($P < 0.05$) (n=3).

Además, se observó que el tamaño de las UFC-GM era menor en el grupo del 5-FU comparado con los demás grupos (Figura 9).

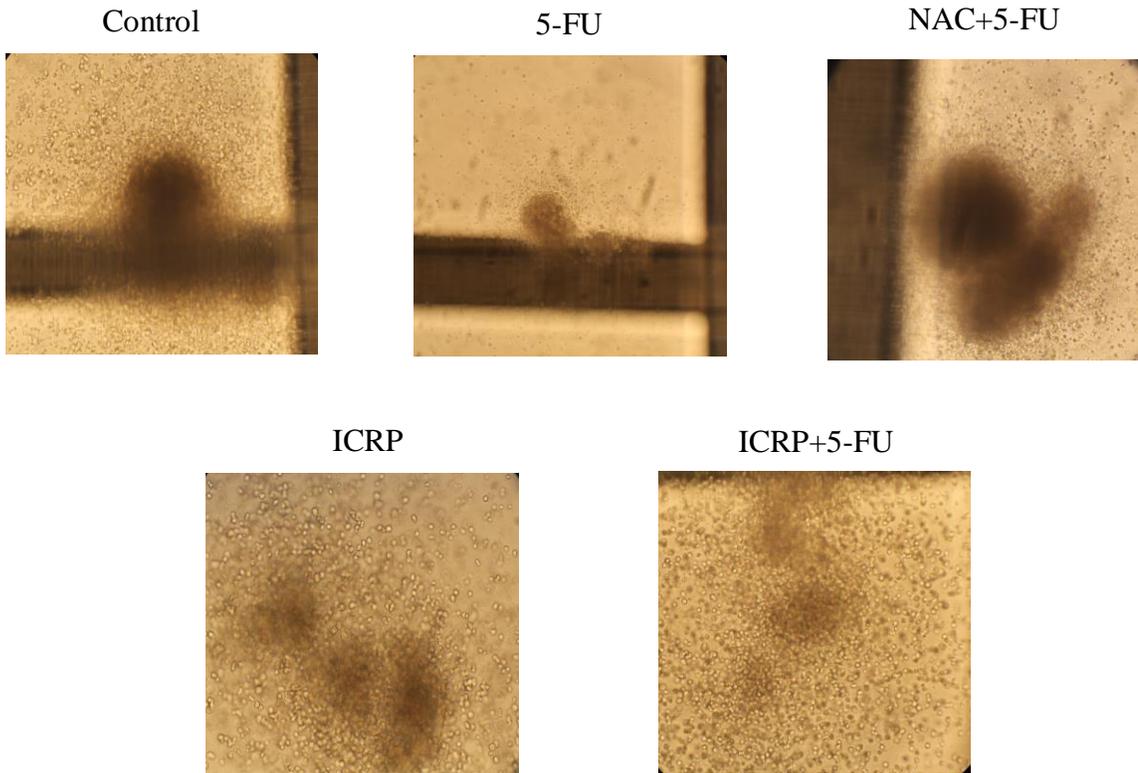


Figura 9. Unidades Formadoras de Colonias Granulocitos/ Monocitos (UFC-GM): imágenes representativas de las colonias formadas en el día uno de evaluación. Imágenes tomadas bajo microscopio invertido a un aumento de 40X.

7.2.- El ICRP no afecta las fases del ciclo celular en las células de médula ósea de los ratones tratados con 5-FU.

El tratamiento con 5-FU disminuyó significativamente la fase de síntesis en las células de médula ósea, el ICRP y el NAC no revirtieron este efecto causado por la quimioterapia. El grupo 5-FU aumentó la fase Sub-G1, la cual indica células en apoptosis en el día 1. Las fases del ciclo celular no se vieron afectadas significativamente por los tratamientos en el día 7 (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto del 5-FU, NAC+5-FU, ICRP e ICRP+5-FU en las fases del ciclo celular en médula ósea de raton

		Fases del ciclo celular (%)			
	Grupos	G0/G1	S	G2/M	Sub G1
Día 1	Control	71.97± 2.80	21.27±1.93	4.32±0.77	2.00±0.27
	5-FU	85.13± 3.25 a	7.92±1.03 a	3.21± 1.06	4.10±1.34 a
	NAC + 5-FU	86.10± 1.93 a	7.40±0.15 a	3.18±0.52	3.67±0.57
	ICRP	71.33± 2.26 b,c	21.67±1.46 b,c	4.17± 1.31	3.20±0.30
	ICRP + 5-FU	89.53± 0.31 a,d	6.15±0.75 a,d	2.86±0.89	3.19±0.99
Día 7	Control	79.27± 1.95	15.87±1.80	4.94± 1.21	2.51±1.09
	5-FU	66.57± 11.05	22.47±6.76	5.82± 1.57	7.37±3.48
	NAC + 5-FU	70.30± 0.95	25.03±0.70	6.56± 2.53	2.12±0.73
	ICRP	73.80± 7.71	18.27±3.95	8.17± 4.09	4.69±1.65
	ICRP + 5-FU	67.40± 2.72	21.70±4.52	8.34± 5.52	5.12±3.63

Datos representados en promedio ± desviación estándar ($P<0.05$) (n=3).

a: Significativamente diferente al control.

b: Significativamente diferente al grupo 5-FU.

c: Significativamente diferente al grupo NAC+5-FU.

d: Significativamente diferentes al grupo ICRP.

7.3.- El ICRP restaura las poblaciones leucocitarias, granulocítica y eritroides en células de médula ósea de ratones tratados con 5-FU.

En el día 1, la población de leucocitos fue disminuida significativamente por el tratamiento con 5-FU, el tratamiento con NAC e ICRP no fue capaz de revertir esta disminución. Los grupos 5-FU y NAC+5-FU evaluados el día 7, presentaron niveles bajos de porcentajes de la expresión de CD45⁺, sin embargo, el grupo ICRP+5-FU presentó porcentajes similares al grupo control. El grupo ICRP no presentó diferencias con respecto al control en el día 1 y 7 de evaluación (Figura 10 a-b).

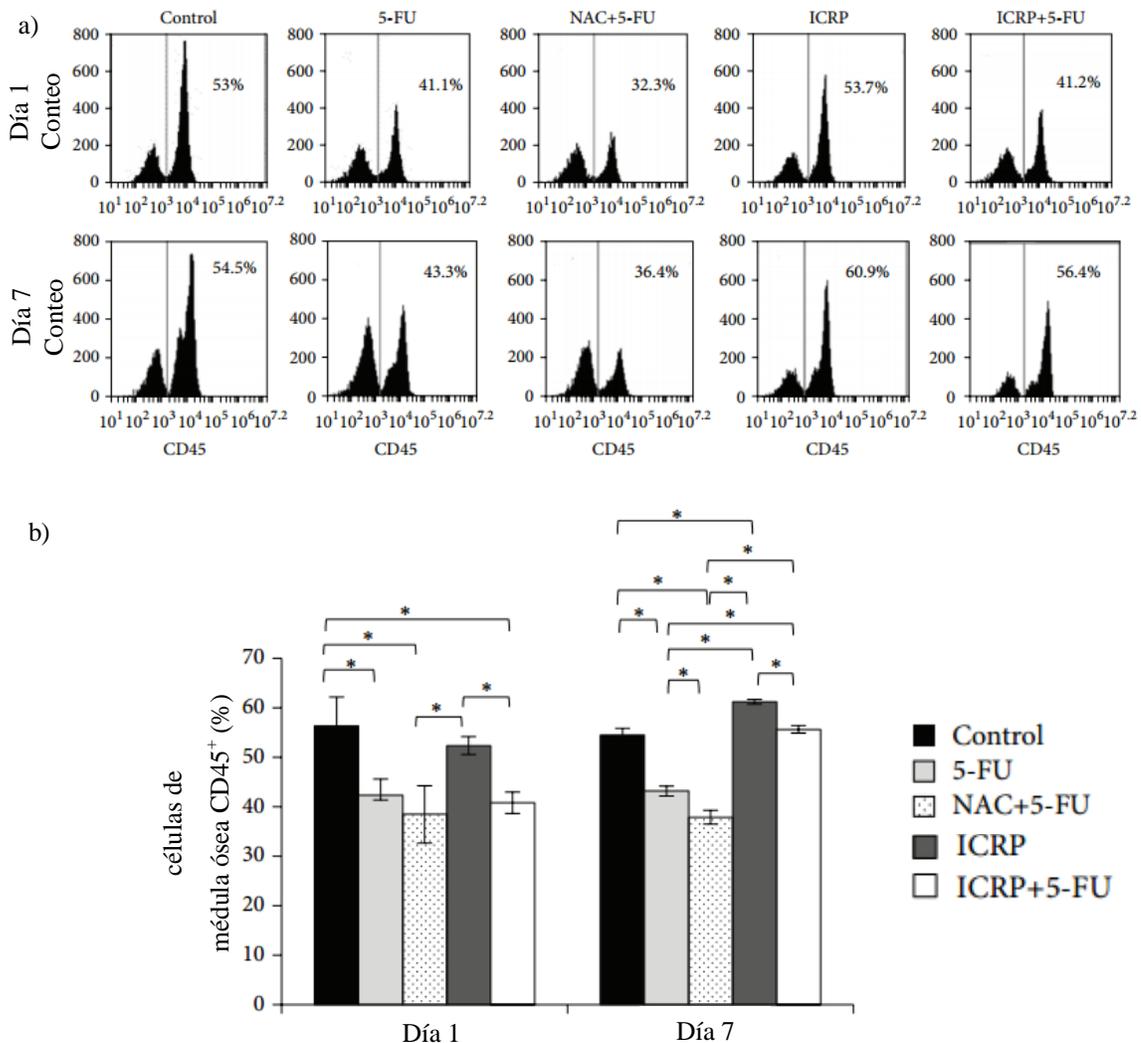


Figura 10. Porcentaje de leucocitos: células de médula ósea fueron obtenidas el día 1 y 7 de los ratones tratados. Posteriormente las células fueron teñidas con anticuerpo CD45 para su análisis por citometría de flujo. a) Resultado representativo del análisis de citometría de flujo. b) Análisis estadístico para células CD45⁺ *($P < 0.05$) (n=3).

La población de granulocitos ($CD11b^+Gr-1^+$) se vió disminuida en el día 1 y 7 de evaluación en los grupos 5-FU y NAC+5-FU. El grupo ICRP+5-FU disminuyó el porcentaje de células $CD11b^+Gr-1^+$ en el día 1 de evaluación, sin embargo, para el día 7 se obtuvieron porcentajes similares al control. El grupo ICRP no presentó cambios significativos en el porcentaje de granulocitos en el día 1 y 7 comparados con el control (Figura 11 a-b)

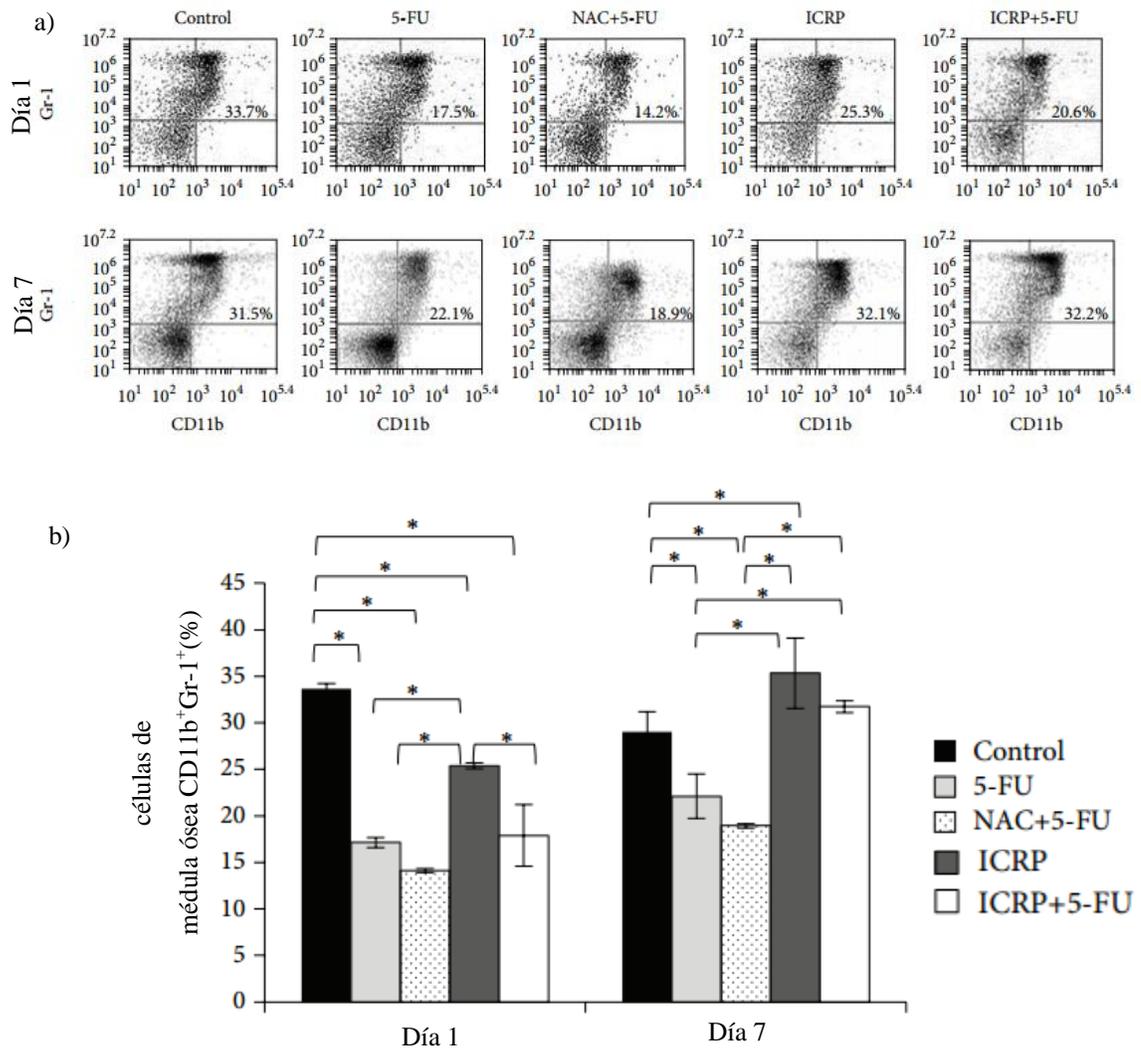


Figura 11. Porcentaje de granulocitos: células de médula ósea fueron obtenidas el día 1 y 7 de los ratones tratados. Posteriormente las células fueron teñidas con anticuerpo CD11b y Gr-1 para su análisis por citometría de flujo. a) Resultado representativo del análisis de citometría de flujo. b) Análisis estadístico para células $CD11b^+Gr-1^+$ ($P < 0.05$) ($n=3$).

El efecto protector del ICRP en el linaje eritroide fue evidente en el día 1 ya que mantuvo el porcentaje de los estadios de eritroblastos basófilos (Terr119^{alto}CD71^{alto}), y eritroblastos ortocromáticos (Terr119^{alto}CD71^{bajo}) comparados con el 5-FU. En el día 7 el tratamiento con 5-FU las regiones de proeritroblastos y eritroblastos basófilos disminuyeron significativamente, los tratamientos NAC+5-FU e ICRP+5-FU fueron capaz de revertir estos efectos secundarios, siendo el cambio más significativo en el grupo de ICRP+5-FU (Figura 12). En la tabla 2 se observan los datos estadísticos de las de los estadios de diferenciación de los eritrocitos.

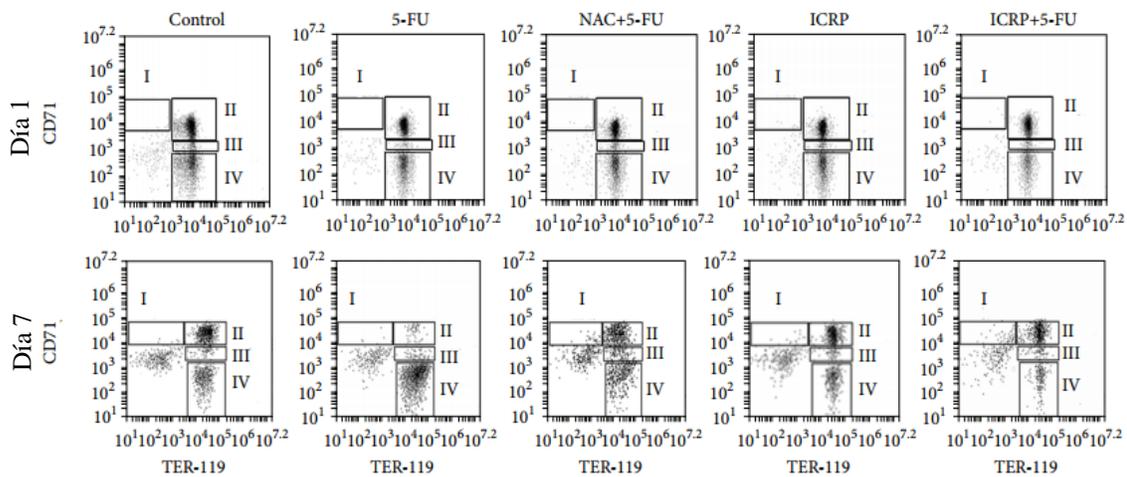


Figura 12. Porcentaje de estadios de diferenciación de eritrocitos: Resultados representativos del análisis de citometría de flujo. Células de médula ósea fueron marcadas con los anticuerpos CD71 y Ter119 para su análisis. Las regiones del I al IV representan la maduración progresiva de las células eritroides. La región I representa a los proeritroblastos; II, eritroblastos basófilos; III, eritroblastos policromáticos; y IV, eritrocitos ortocromáticos y células rojas enucleadas.

Tabla 2: Efecto del 5-FU, NAC+5-FU, ICRP e ICRP+5-FU en poblaciones de origen eritroide

Grupos		I Proeritroblastos	II Eritroblastos basófilos	III Eritroblastos policromáticos	IV Eritroblasto ortocromático/ células enucleadas
Día 1	Control	0.53 ± 0.06	49.00 ± 2.65	6.60 ± 0.46	25.17 ± 1.07
	5-FU	0.07 ± 0.12 a	40.07 ± 4.56 a	3.50 ± 0.20 a	31.03 ± 2.57 a
	NAC+5-FU	0.23 ± 0.06	39.67 ± 3.28 a	5.50 ± 0.30 a,b	26.93 ± 2.93
	ICRP	0.30 ± 0.00 b	51.80 ± 0.36 b,c	6.50 ± 0.30 b,c	20.53 ± 0.45 b,c
	ICRP+5-FU	0.20 ± 0.10	57.03 ± 2.59 b,c	4.20 ± 0.26 a,c,d	20.20 ± 1.55 a,b,c
Día 7	Control	0.33 ± 0.05	48.3 ± 1.95	3.10 ± 0.87	20.57 ± 2.48
	5-FU	0.27 ± 0.11	1.70 ± 0.26 a	3.50 ± 0.88	71.87 ± 4.48 a
	NAC+5-FU	4.40 ± 2.40 a,b	27.3 ± 5.66 b	6.67 ± 1.52 a,b	21.63 ± 3.3 b
	ICRP	0.63 ± 0.05 c	51.9 ± 3.93 b,c	4.90 ± 0.40	20.77 ± 4.31 b
	ICRP+5-FU	4.13 ± 0.77 a,b,d	52.1 ± .59 b,c	6.83 ± 0.70 a,b	16.30 ± 1.57 b

Datos representados en promedio ± desviación estándar ($P < 0.05$) (n=3).

a: Significativamente diferente al control.

b: Significativamente diferente al grupo 5-FU.

c: Significativamente diferente al grupo NAC+5-FU.

d: Significativamente diferentes al grupo ICRP.

7.4.- El ICRP disminuye la formación de ROS/Superóxido y la activación de Nrf2 inducida por 5-FU.

El grupo 5-FU presentó un aumento significativo en la producción de ROS y superóxido desde el día 1 permaneciendo hasta el día7 de evaluación. Los grupos NAC+5-FU e ICRP+5-FU fueron capaces de controlar la producción de los oxidantes causados por la quimioterapia en el día 1 y el día 7 de evaluación ($P < 0.05$), siendo mejor en este tiempo de evaluación. El grupo ICRP no presentó diferencia significativa con respecto al control (Figura 13).

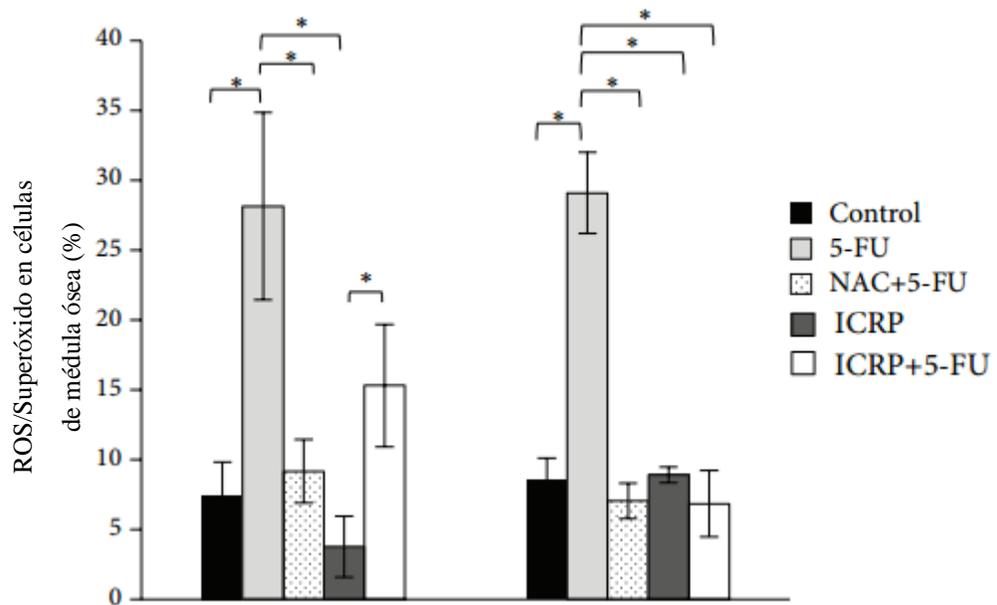


Figura 13. Porcentaje de formación de ROS/Superóxido: Células de médula ósea fueron marcadas con el colorante para detección ROS y superóxido el día 1 y 7 para ser analizados por citometría de flujo * ($P < 0.05$) (n=3).

Los grupos 5-FU e ICRP+5-FU aumentaron la activación del factor de transcripción Nrf2 en el día 1 de evaluación con respecto al grupo control, sin embargo, solo el grupo ICRP+5-FU disminuyó este parámetro para el día 7 obteniendo valores similares al control. Por el contrario, el grupo NAC+5-FU aumentó la activación de Nrf2 al séptimo día de evaluación (Figura 14).

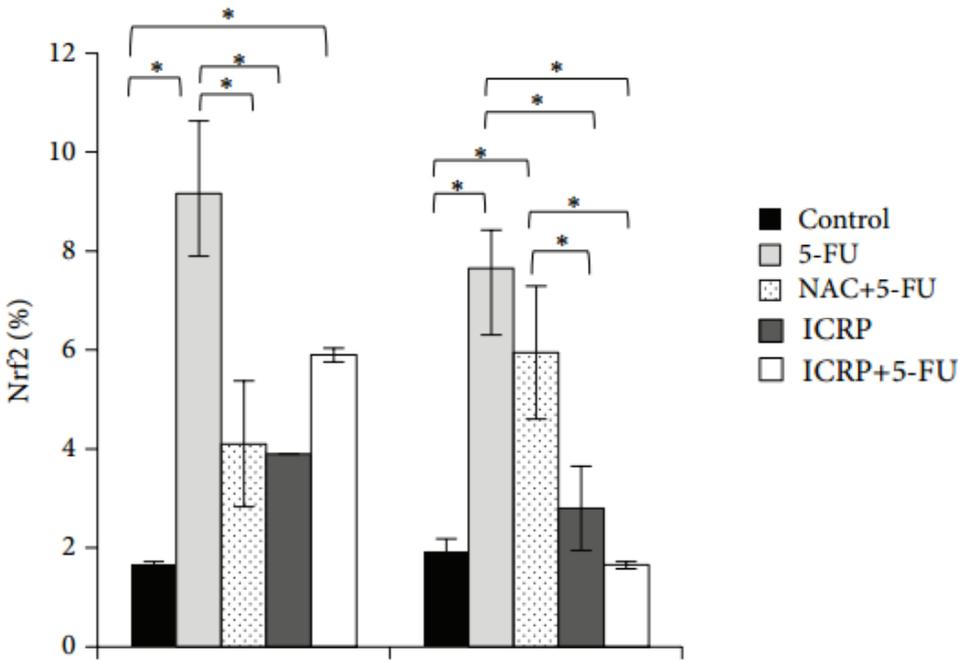


Figura 14. Porcentaje de activación de Nrf2: Células de médula ósea fueron marcadas intracelularmente con un anticuerpo Nrf2 el día 1 y 7 para ser analizados por citometría de flujo ($P < 0.05$) (n=3).

7.5.- Cortes histológicos

El tratamiento con 5-FU disminuyó la densidad celular en la médula ósea, creando un ambiente de hipocelularidad, con una marcada disminución de megacariocitos, células granulocíticas y células precursoras. En los grupos NAC+5-FU e ICRP+5-FU se observó histológicamente una mayor celularidad y una proporción normal entre células precursoras y diferenciadas, tanto en el día 1 como en el día 7. El grupo ICRP presentó tejido mieloide normal (Figura 15).

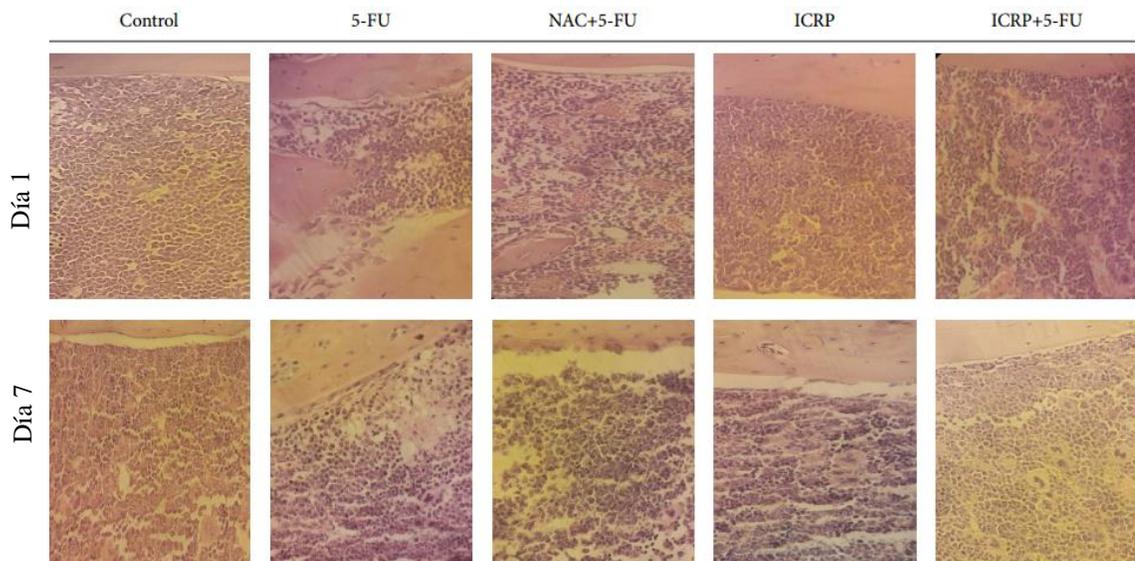


Figura 15. Cortes histológicos de médula ósea: el día 1 y 7 fue tomado el fémur derecho de los ratones tratados fueron fijados, descalcificados, seccionados y teñidos con hematoxilina y eosina. La descripción histológica fue realizada por un patólogo bajo un microscopio a 40X.

7.6.- Efectos del ICRP sobre la hematotoxicidad y la ganancia de peso en los ratones tratados con 5-FU

Se examinó los efectos del ICRP sobre el 5-FU en el conteo de células rojas, hemoglobina, hematocrito, conteo de células blancas y plaquetas. El grupo 5-FU presento anemia y eritropenia, disminuyendo el nivel de hematocrito en los días 1 y 7, la leucopenia solo se observó en el día 1. El grupo de ICRP+5-FU evito los efectos secundarios, ya que sus valores fueron similares al grupo control en el día 1 y 7 (tabla 3).

Tabla 3: Efecto del 5-FU, NAC+5-FU, ICRP e ICRP+5-FU en análisis de sangre periférica en ratones tratados

Análisis de sangre periférica						
Grupos	RBC $\times 10^6$	HB g/dL	HCT (%)	WBC mm^3	PLT mm^3	
Día 1	Control	8.00 \pm 0.35	12.50 \pm 0.85	36 \pm 4	4.67 \pm 0.49	534.33 \pm 170.28
	5-FU	4.43 \pm 0.31 ^a	6.87 \pm 0.61 ^a	20 \pm 2 ^a	1.50 \pm 0.44 ^a	318.33 \pm 123.31
	NAC + 5-FU	6.97 \pm 0.81 ^b	11.30 \pm 1.39 ^b	32 \pm 5 ^b	2.23 \pm 0.85	393.00 \pm 54.29
	ICRP	8.30 \pm 0.44 ^b	13.10 \pm 0.72 ^b	39 \pm 2 ^b	6.37 \pm 1.77 ^{b,c}	448.67 \pm 108.84
	ICRP + 5-FU	6.90 \pm 1.14 ^b	11.03 \pm 1.61 ^b	32 \pm 5 ^b	4.13 \pm 0.91	472.33 \pm 159.53
Día 7	Control	7.60 \pm 0.92	11.63 \pm 1.65	34 \pm 6	5.03 \pm 0.95	525.00 \pm 184.01
	5-FU	4.83 \pm 1.27 ^a	7.73 \pm 2.48 ^a	22 \pm 7	3.13 \pm 1.90	260.67 \pm 122.92
	NAC + 5-FU	6.93 \pm 0.59 ^b	10.50 \pm 0.95	32 \pm 3	5.60 \pm 3.74	380.00 \pm 34.18
	ICRP	8.63 \pm 0.15 ^b	13.43 \pm 0.50 ^b	42 \pm 5 ^b	6.27 \pm 1.87	470.67 \pm 82.78
	ICRP + 5-FU	7.73 \pm 0.35 ^b	12.17 \pm 0.45 ^b	36 \pm 2 ^b	4.57 \pm 1.10	600.00 \pm 89.21 ^b

Datos representados en promedio \pm desviación estándar ($P < 0.05$) (n=3).

a: Significativamente diferente al control.

b: Significativamente diferente al grupo 5-FU.

c: Significativamente diferente al grupo NAC+5-FU.

d: Significativamente diferentes al grupo ICRP.

Los grupos ICRP e ICRP+5-FU fueron capaces de aumentar el peso corporal similar al grupo control después de 7 días de iniciar el tratamiento con quimioterapia. Sin embargo, los grupos 5-FU y NAC+5-FU ganaron aproximadamente la mitad de peso que el grupo control (Tabla 4).

Tabla 4: Efecto de 5-FU, NAC+5-FU, ICRP e ICRP+5-FU en la ganancia de peso corporal de los ratones tratados

Grupo	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Ganancia de peso corporal(g)
Control	26.50 ± 3.00	29.75 ± 2.63	3.25±0.50
5-FU	24.00 ± 4.62	25.25 ± 4.35	1.25±0.50 a
NAC+5-FU	23.50 ± 5.20	25.25 ± 5.06	1.75±0.50 a
ICRP	25.50 ± 4.51	29.00 ± 4.97	3.50±0.58 b, c
ICRP+5-FU	25.75 ± 3.59	28.75 ± 4.03	3.00±0.82 b

Datos representados en promedio ± desviación estándar ($P<0.05$) (n=3).

a: Significativamente diferente al control.

b: Significativamente diferente al grupo 5-FU.

c: Significativamente diferente al grupo NAC+5-FU.

d: Significativamente diferentes al grupo ICRP.

8.- DISCUSION

El 5-FU es ampliamente utilizado como agente terapéutico desde su descubrimiento para tratar una gran variedad de tumores, incluyendo el cáncer colorectal, de mama y carcinomas hepáticos (Grem, 2000). La toxicidad hematológica inducida por la quimioterapia se relaciona con altas dosis terapéuticas afectando la calidad de vida de los pacientes (Brennig *et al.*, 2015). Para estudiar el efecto de mielosupresión inducida por la quimioterapia se emplea el 5-FU (Comte *et al.*, 1998; Hofer *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2012; Kojima *et al.*, 2003; Kriegler *et al.*, 1994; Numazawa *et al.*, 2011; Raghavendran *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2015; Takano *et al.*, 2004). En el presente estudio se corroboró que una sola dosis de 5-FU a 75 mg/kg reduce el número de UFC-GM (Numazawa *et al.*, 2011), lo cual indica que el compromiso de diferenciación y el potencial proliferativo de las células de médula ósea se ven afectados por la quimioterapia (Sheikhzadeh *et al.*, 2001).

El tratamiento con ICRP demostró ser un quimioprotector eficaz contra el 5-FU, debido a función protectora en las células de médula ósea, efectos similares son reportados con el radioprotector amifostina, que es utilizado actualmente en clínica (Orditura *et al.*, 1999). El efecto protector del ICRP, en las células progenitoras se correlaciona con los datos obtenidos por citometría de flujo, donde linajes más comprometidos en la médula ósea, tales como los leucocitos, granulocitos y poblaciones eritroides son disminuidas por el tratamiento con 5-FU (Takano *et al.*, 2004; Vemula *et al.*, 2012); de igual manera este efecto protector se vio reflejado a nivel sistémico demostrando que los valores hematológicos de leucocitos y glóbulos rojos fueron normales. Otros estudios han utilizado en modelos animales estos parámetros para evaluar la recuperación de la médula ósea después del tratamiento con quimioterapia (Hartley *et al.*, 2003; Udupa and Lipschitz, 1989). Con los resultados obtenidos con el ICRP se pretende reducir las infecciones y anemias en pacientes que reciben quimioterapia (Lindkær-Jensen *et al.*, 2015).

En este estudio, se utilizó el análisis del ciclo celular para determinar si la protección observada estaba relacionada con el cambio en alguna fase del ciclo celular después del tratamiento con 5-FU. Es conocido que el 5-FU ejerce su toxicidad en células con proliferación activa (fase de síntesis) incluyendo células sanas y cancerosas (Focaccetti *et al.*, 2015; Shirasaka, 2009). Agentes como el tetrapéptido AcSDKP y el TGF- β pueden proteger a las células progenitoras de la médula debido a la inducción del arresto celular en la fase G0, siendo una alternativa a la terapia de quimioprotección (Comte *et al.*, 1998; Shiotsu *et al.*, 2000), en nuestro estudio el ICRP y el NAC no afectaron el ciclo celular en las células de médula ósea, lo que sugiere otro mecanismo de acción en la protección contra el 5-FU.

Se sabe que el 5-FU es capaz de inducir estrés oxidativo en células de médula ósea lo que conduce a la activación del factor de transcripción Nrf2 (Akhdar *et al.*, 2009; Numazawa *et al.*, 2011), por lo tanto distintos investigadores explican el mecanismo de quimioprotección de diferentes compuestos por su capacidad para activar la respuesta antioxidante y la neutralización de ROS (Ma and Kinneer, 2002). Nuestros resultados indican que el ICRP fue capaz de disminuir la producción de ROS y superóxido así como la activación de Nrf2 en las células de los ratones tratados con 5-FU, esto podría deberse a la capacidad antioxidante del ICRP al aumentar las enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Franco-Molina *et al.*, 2011). Son necesarios más estudios para dilucidar si estas enzimas son las responsables de la disminución de ROS en la médula ósea. Se sugiere que el ICRP puede actuar como molécula captadora de radicales libres, similar a los amino-tioles y los fosforotioatos, dos agentes protectores ampliamente utilizados (Schweitzer *et al.*, 2010).

Todos estos resultados de quimioprotección se reflejan en nuestro análisis histopatológico, en donde se observa una arquitectura y celularidad conservada de la médula ósea. Es de importancia que los pacientes que reciben quimioterapia puedan mantener su peso con el fin de mejorar su calidad de vida (Imayama *et al.*, 2013), en el presente trabajo se observó que el ICRP ayudó a mantener una ganancia de peso normal en los ratones tratados con 5-FU, lo que indica que el ICRP puede mejorar la calidad de

vida de los pacientes con cáncer. En el caso del quimioprotector comercial NAC es conocido que protege de la citotoxicidad inducida por el cisplatino en las líneas celulares tumorales humanas *in vitro* al bloquear el receptor de muerte mitocondrial y ciertas vías de apoptosis (Wu *et al.*, 2005), por esta razón estudios *in-vitro* e *in-vivo* son realizados en la actualidad por nuestro equipo de investigación para determinar si el ICRP tiene acción antagonista en células tumorales tratadas con quimioterapia. Estudios anteriores en el laboratorio demuestran que pacientes con cáncer de mama y pulmón tratados con quimioterapia y el tratamiento adyuvante con ICRP no cursaron con los efectos secundarios, sin afectar la regresión tumoral (Franco-Molina *et al.*, 2008; Lara *et al.*, 2010).

9.- CONCLUSIONES

1. El ICRP incrementa el número de células de médula ósea en los ratones tratados con 5-FU.
2. El ICRP aumentó el número de UFC-GM en las células de médula ósea de los ratones tratados con 5-FU.
3. El ICRP no modificó las fases del ciclo celular en las células de médula ósea de los ratones tratados con 5-FU.
4. El ICRP protegió el porcentaje de los linajes mieloides y eritroides en la médula ósea de los ratones tratados con 5-FU.
5. El ICRP disminuyó las especies reactivas de oxígeno producidas por el 5-FU en células de médula ósea de ratón.
6. El ICRP disminuyó la activación de Nrf2 causada por el 5-FU en células de médula ósea de ratón.
7. El ICRP tiene la capacidad de mantener la celularidad adecuada y proporción normal de células progenitoras y diferenciadas en médula ósea de ratones tratados con 5-FU.
8. El ICRP evitó el desarrollo de anemia, eritropenia y leucopenia en los ratones tratados con 5-FU.
9. El ICRP mantuvo una ganancia de peso normal en los ratones tratados con 5-FU.

10.- PERSPECTIVA

Es importante considerar enfocar investigaciones relacionadas al tratamiento de los efectos secundarios inducidos por la quimioterapia, tales como evaluar el efecto del ICRP en la emesis provocada por la quimioterapia, así como el dilucidar si el ICRP es capaz de proteger a células del cuerpo de reproducción rápida como son las células del intestino delgado.

Considerando realizar estudios pre-clínicos en modelos animales caninos, en donde se puedan incluir esquemas completos de quimioterapia con más de un ciclo de tratamiento y diferentes tipos de tumores.

De igual manera es crucial crear investigaciones que se enfoquen en conocer el mecanismo por el cual el ICRP es capaz de proteger células sanas de los efectos tóxicos de la quimioterapia.

11.- BIBLIOGRAFÍA

1. Abd-Allah ARA, Al-Majed AA, Al-Yahya AA, Fouda SI, Al-Shabana OA. 2005. L-Carnitine halts apoptosis and myelosuppression induced by carboplatin in rat bone marrow cell cultures (BMC). *Arch. Toxicol* 79: 406–413.
2. Aguirre R., Romero MV, Juaristi M, Alvarez J, Zaninovich M, Casco K, Piñeyro R, Testi S, Brandon J. 2000. Comportamiento del tejido hemopoyético normal tratado con cilofosfamida o en combinación con un citoprotector (ETHYL). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 1:1-4.
3. Akhdar H, Loyer P, Rauch C, Corlu A, Guillouzo A, Morel F. 2009. Involvement of Nrf2 activation in resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer HT-29 cells. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 45: 2219–2227.
4. Aldaco-Sarvide F, Pérez-Pérez P, Cervantes-Sánchez G, Torrecillas-Torres L, Erazo-V AE. 2012. Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños. *Gac. Mex. Oncol.* 11:371–379.
5. Alexander WS. 1998. Cytokines in Hematopoiesis. *Int. Rev. Immunol.* 16, 651-682.
6. Barnet K, Vacek A, Cech K, Pekárek J. 1996. The effect of DLE fractions on GM-progenitors of haematopoietic stem cells in vitro. *Biotherapy Dordr. Neth.* 9: 171–174.
7. Brenning S, Lachmann N, Buchegger T, Hetzel M, Schambach A, Moritz T. 2015. Chemoprotection of murine hematopoietic cells by combined gene transfer of cytidine deaminase (CDD) and multidrug resistance 1 gene (MDR1). *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34: 148-160.

8. Carey MP, Burish TG. 1988. Etiology and treatment of the psychological side effects associated with cancer chemotherapy: a critical review and discussion. *Psychol. Bull.* 104: 307–325.
9. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56:289–301.
10. Comte L, Lorgeot V, Bignon J, Volkov L, Dupuis F, Wdzieczak-Bakala J, Praloran V. 1998. In vivo modifications of AcSDKP metabolism and haematopoiesis in mice treated with 5-fluorouracil and Goralatide. *Eur. J. Clin. Invest.* 28: 856–863.
11. Copley MR, Beer PA, Eaves CJ. 2012. Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity Takes Center Stage. *Cell Stem Cell* 10: 690–697.
12. Crawford J, Dale DC, Lyman GH. 2004. Chemotherapy-induced neutropenia: risks, consequences, and new directions for its management. *Cancer* 100: 228-237.
13. Dalmau SR, Freitas CS, Savino W. 1997. Radio- and chemoprotection of bone marrow cells by opposite cell cycle-acting cytokines. *Leuk. Res.* 21: 93–99.
14. Das B, Antoon R, Tsuchida R, Lotfi S, Morozova O, Farhat W, Malkin D, Koren G, Yeger H, Baruchel S. 2008. Squalene selectively protects mouse bone marrow progenitors against cisplatin and carboplatin-induced cytotoxicity in vivo without protecting tumor growth. *Neoplasia.* 10: 1105–1119.
15. DeVita VT, Chu E. 2008. A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.* 68: 8643–8653.

16. Diasio DRB, Harris BE. 1989. Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Clin. Pharmacokinet.* 16: 215–237.
17. Dinarello CA. 1989. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* 44: 153–205.
18. Dröge W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82: 47–95.
19. El-Sayed ESM, Abdel Aziz AAH, Helal GK, Saleh S, Saad AS. 2010. Protective effect of N-acetylcysteine against carmustine-induced myelotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 48: 1576–1580.
20. El-Sayed ESM, Abdel-Aziz AAH, Saleh S, Saad AS. 2011. The chemopreventive effect of dimethylthiourea against carmustine-induced myelotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 49: 1965–1969.
21. Fainstein MK. 2007. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* 26: 18–25.
22. Ferreiro J, García JL, Barceló R, Rubio I. 2003. Quimioterapia: efectos secundarios. *Gac. Médica Bilbao* 100: 69–74.
23. Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, Bucci EO, Finzi G, Sessa F, Noonan DM, Albini A. 2015. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PloS One* 10: 1156-86.

24. Francke A, Herold J, Weinert S, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC. 2011. Generation of Mature Murine Monocytes from Heterogeneous Bone Marrow and Description of Their Properties. *J. Histochem. Cytochem.* 59: 813–825.
25. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2005. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates the nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated murine peritoneal macrophages in vitro. *J. Med. Food* 8: 20–26.
26. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2004. Bovine dialyzable leukocyte extract protects against LPS-induced, murine endotoxic shock. *Int. Immunopharmacol.* 4: 1577–1586.
27. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-Tello P, Isaza-Brando CE, García MEV, Castillo-León, L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2007. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates cytokines and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated human blood cells. *Cytotherapy* 9: 379–385.
28. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández DF, Sierra-Rivera, CA, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2011. Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5: 3726–3736.
29. Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Castillo-Tello P, García de la Fuente A, Mendoza RD, Garza RG, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2008. IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy* 10: 490–496.

30. Friberg LE, Karlsson MO. 2003. Mechanistic models for myelosuppression. *Invest. New Drugs* 21: 183–194.
31. Gd RAB, D H, W M, 1987. Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60, and HEL cells. *Exp. Hematol.* 15: 928–935.
32. Gothot A, Pyatt R, McMahel J, Rice S, Srour EF. 1998. Assessment of proliferative and colony-forming capacity after successive in vitro divisions of single human CD34+ cells initially isolated in G0. *Exp. Hematol.* 26: 562–570.
33. Grem JL. 2000. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest. New Drugs* 18: 299–313.
34. Groopman JE, Itri LM. 1999. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 1616–1634.
35. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. 2004. Plasticity of Bone Marrow–Derived Stem Cells. *STEM CELLS* 22: 487–500.
36. Guest I, Utrecht J. 2001. Bone marrow stem cell protection from chemotherapy by low–molecular-weight compounds. *Exp. Hematol.* 29: 123–137.
37. Hall PA, Watt FM. 1989. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Dev. Camb. Engl.* 106: 619–633.
38. Han YH, Park WH. 2009. The effects of N-acetyl cysteine, buthionine sulfoximine, diethyldithiocarbamate or 3-amino-1,2,4-triazole on antimycin A-treated Calu-6 lung cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and glutathione. *Oncol. Rep.* 22: 385–391.

39. Harrison SD, Denine EP, Peckham JC. 1978. Qualitative and quantitative toxicity of single and sequential sublethal doses of 5-fluorouracil in BDF mice. *Cancer Treat. Rep.* 62: 533–545.
40. Hartley C, Elliott S, Begley CG, McElroy P, Sutherland W, Khaja R, Heatherington AC, Graves T, Schultz H, Del Castillo J, Molineux G. 2003. Kinetics of haematopoietic recovery after dose-intensive chemo/radiotherapy in mice: optimized erythroid support with darbepoetin alpha. *Br. J. Haematol.* 122: 623–636.
41. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach I, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J. 1957. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179: 663–666.
42. Hofer M, Pospíšil M, Znojil V, Holá J, Vacek A, Streitová D. 2007. Adenosine A(3) receptor agonist acts as a homeostatic regulator of bone marrow hematopoiesis. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 61: 356–359.
43. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. 1987. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 9035–9039.
44. Ikuta K, Uchida N, Friedman J, Weissman IL. 1992. Lymphocyte Development from Stem Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 759–783.
45. Imayama I, Alfano CM, Neuhaus ML, George SM, Smith AW, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Bernstein L, Wang CY, Duggan C, Ballard-Barbash R, McTiernan A. 2013. Weight, inflammation, cancer-related symptoms and health-related quality of life among breast cancer survivors. *Breast Cancer Res. Treat.* 140:159–176.

46. (INEGI). Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI [WWW Document]. INEGI. URL <http://www.inegi.org.mx/> (accessed 2.16.16).
47. Infocáncer. Resumen [WWW Document], URL <http://www.infocancer.org.mx/resumen-con780i0.html> (accessed 2.16.16).
48. Jeong BE, Ko EJ, Joo HG. 2012. Cytoprotective effects of fucoidan, an algae-derived polysaccharide on 5-fluorouracil-treated dendritic cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 50: 1480–1484.
49. Kadoyama K, Miki I, Tamura T, Brown JB, Sakaeda T, Okuno Y. 2012. Adverse event profiles of 5-fluorouracil and capecitabine: data mining of the public version of the FDA Adverse Event Reporting System, AERS, and reproducibility of clinical observations. *Int. J. Med. Sci.* 9: 33–39.
50. Kasiappan R, Safe SH. 2016. ROS-Inducing Agents for Cancer Chemotherapy. *React. Oxyg. Species* 1: 22–37.
51. Kawakatsu M, Urata Y, Goto S, Ono Y, Li TS. 2013. Placental extract protects bone marrow-derived stem/progenitor cells against radiation injury through anti-inflammatory activity. *J. Radiat. Res.* 54: 268–276.
52. Kojima S, Takaba K, Kimoto N, Takeda T, Kakuni M, Mizutani M, Suzuki K, Sato H, Hara T. 2003. Protective effects of glutathione on 5-fluorouracil-induced myelosuppression in mice. *Arch. Toxicol.* 77, 285–290. doi:10.1007/s00204-003-0448-9
53. Kozutsumi H. 1996. Special Education. *The Oncologist* 1: 116–118.
54. Kriegler AB, Bernardo D, Verschoor SM. 1994. Protection of murine bone marrow by dexamethasone during cytotoxic chemotherapy. *Blood* 83:65–71.

55. Ladd AC, Pyatt R, Gothot A, Rice S, McMahel J, Traycoff CM, Srour EF. 1997. Orderly process of sequential cytokine stimulation is required for activation and maximal proliferation of primitive human bone marrow CD34+ hematopoietic progenitor cells residing in G0. *Blood* 90: 658–668.
56. Lara HH, Turrent LI, Garza-Treviño EN, Tamez-Guerra R, Rodriguez-Padilla C. 2010. Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant. *Exp. Ther. Med.* 1:425–431.
57. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. 2008. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol. Res.* 58:262–270.
58. Leung CG, Xu Y, Mularski B, Liu H, Gurbuxani S, Crispino JD. 2007. Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *J. Exp. Med.* 204: 1603–1611.
59. Lindkær-Jensen S, Larsen S, Habib-Lindkær-Jensen N, Fagertun HE. 2015. Positive effects on hematological and biochemical imbalances in patients with metastatic breast cancer stage IV, of BP-C1, a new anticancer substance. *Drug Des. Devel. Ther.* 9:1481–1490.
60. Lindl KA, Jordan-Sciutto KL. 2008. Examining the endogenous antioxidant response through immunofluorescent analysis of Nrf2 in tissue. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 477: 229–243.
61. Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. 2005. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ. Res.* 97: 967–974.

62. Liu MJ, Wang Z, Ju Y, Wong RNS, Wu QY. 2004. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 55:79–90.
63. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3: 330–338.
64. Lu H, Zhu S, Qian L, Xiang D, Zhang W, Nie A, Gao J, Wu M, Lu B, Yu Y, Han W, Moldenhauer A. 2012. Activated expression of the chemokine Mig after chemotherapy contributes to chemotherapy-induced bone marrow suppression and lethal toxicity. *Blood* 119:4868–4877.
65. Ma Q. 2013. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53:401–426.
66. Ma Q, Kinneer K. 2002. Chemoprotection by Phenolic Antioxidants Inhibition of Tumor Necrosis Factor A Induction In Macrophages. *J. Biol. Chem.* 277:2477–2484.
67. Manascero G, AR. 2003. Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá, pp. 133-134.
68. Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2006. In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy* 8:408–414.
69. Moore MA, Warren DJ. 1987. Synergy of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor: in vivo stimulation of stem-cell recovery and hematopoietic

regeneration following 5-fluorouracil treatment of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7134–7138.

70. Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R. 2007. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 51:723–729.
71. Nand S, Sosman J, Godwin JE, Fisher RI. 1994. A phase I/II study of sequential interleukin-3 and granulocyte- macrophage colony-stimulating factor in myelodysplastic syndromes. *Blood* 83:357–360.
72. Numazawa S, Sugihara K, Miyake S, Tomiyama H, Hida A, Hatsuno M, Yamamoto M, Yoshida T. 2011. Possible involvement of oxidative stress in 5-fluorouracil-mediated myelosuppression in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108:40–45.
73. Olsson B, Johansson M, Gabrielsson J, Bolme P. 1988. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 34:77–82.
74. Orditura M, De Vita F, Roscigno A, Infusino S, Auriemma A, Iodice P, Ciaramella F, Abbate G, Catalano G. 1999. Amifostine: A selective cytoprotective agent of normal tissues from chemo-radiotherapy induced toxicity (Review). *Oncol. Rep.* 6: 1357–1362.
75. Paukovits JB, Paukovits, WR. 1995. Stem cell stimulation in vitro by the decapeptide (pEEDCK)₂: a single-factor alternative for multifactor cocktails. *Leukemia. Suppl.* 1:48-52.
76. Paukovits WR, Laerum OD. 1982. Isolation and synthesis of a hemoregulatory peptide. *Z. Für Naturforschung Sect. C Biosci.* 37:1297–1300.

77. Pösel C, Möller K, Fröhlich W, Schulz I, Boltze J, Wagner DC. 2012. Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield. *PLoS One*. 7:502-93.
78. Prado CMM, Baracos VE, McCargar LJ, Mourtzakis M, Mulder KE, Reiman T, Butts CA, Scarfe AG, Sawyer MB. 2007. Body Composition as an Independent Determinant of 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy Toxicity. *Clin. Cancer Res.* 13:3264–3268.
79. Radley JM, Scurfield G. 1979. Effects of 5-fluorouracil on mouse bone marrow. *Br. J. Haematol.* 43: 341–351.
80. Radomska-Lesniewska DM, Skopinski P. 2012. N-acetylcysteine as an antioxidant and anti-inflammatory drug and its some clinical applications. *Cent. Eur. J. Immunol.* 37:57–66.
81. Raghavendran HRB, Sathyanath R, Shin J, Kim HK, Han JM, Cho J, Son CG. 2012. *Panax ginseng* Modulates Cytokines in Bone Marrow Toxicity and Myelopoiesis: Ginsenoside Rg1 Partially Supports Myelopoiesis. *PLoS ONE* 7: e33733.
82. Ramshaw HS, Rao SS, Crittenden RB, Peters SO, Weier HU, Quesenberry PJ. 1995. Engraftment of bone marrow cells into normal unprepared hosts: effects of 5-fluorouracil and cell cycle status. *Blood* 86:924–929.
83. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105–111.
84. Ripich T, Jessberger R. 2011. SWAP-70 regulates erythropoiesis by controlling $\alpha 4$ integrin. *Haematologica* 96:1743–1752.

85. Rodak BF. 2005. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. Ed. Médica Panamericana. Estados Unidos: Indianapolis, pp. 106-107.
86. Rubbia-Brandt L, Audard V, Sartoretti P, Roth AD, Brezault C, Charpentier ML, Dousset B, Morel P, Soubrane O, Chaussade S, Mentha G, Terris B. 2004. Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 15:460–466.
87. Rushworth GF, Megson IL. 2014. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol. Ther.* 141:150–159.
88. Rushworth SA, MacEwan DJ. 2011. The Role of Nrf2 and Cytoprotection in Regulating Chemotherapy Resistance of Human Leukemia Cells. *Cancers* 3: 1605–1621.
89. Sarah Payne D M. 2008. Mechanisms of anticancer drugs, in: Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery 7Ed. Estados Unidos, pp. 34–46.
90. Sarkar C, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. 2015. Dopamine is a safe antiangiogenic drug which can also prevent 5-fluorouracil induced neutropenia. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 137:744–749.
91. Schilsky RL. 1998. Biochemical and clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Oncol. Williston Park* 12:13–18.
92. Schweitzer AD, Revskaya E, Chu P, Pazo V, Friedman M, Nosanchuk JD, Cahill S, Frases S, Casadevall A, Dadachova E. 2010. Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 78:1494–1502.

93. Sheikhzadeh S, Hammers HJ, Hartwig D, Kirchner H, Schlenke P. 2001. Improvement of the Precision in CFU-GM and BFU-E Counting by Flow Cytometry-Based Standardization of Short-Term Culture Assays. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10:881–885.
94. Shiotsu Y, Yamashita K, Kanai F, Ikuina Y, Murakata C, Teramura M, Mizoguchi H, Tamaoki T, Akinaga S. 2000. Chemoprotective effects of KF41399, a derivative of carbazole compounds, on nimustine-induced thrombocytopenia. *Blood* 95:3771–3780.
95. Shirasaka T. 2009. Development history and concept of an oral anticancer agent S-1 (TS-1): its clinical usefulness and future vistas. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 39:2–15.
96. Shokrzadeh M, Naghshvar F, Ahmadi A, Chabra A, Jeivad F. 2014. The potential ameliorative effects of melatonin against cyclophosphamide-induced DNA damage in murine bone marrow cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 18:605–611.
97. Short B, Wagey R. 2013. Isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 946:335–347.
98. Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF. 2001. Ineffective erythropoiesis in *Stat5a*^{-/-5b}^{-/-} mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 98:3261–3273.
99. Srinoun K, Svasti S, Chumworathayee W, Vadolas J, Vattanaviboon P, Fucharoen S, Winichagoon P. 2009. Imbalanced globin chain synthesis determines erythroid cell pathology in thalassemic mice. *Haematologica* 94:1211–1219.

100. Sudhakar A. 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J. Cancer Sci. Ther.* :1–4.
101. Sun HX, Peng XY. 2008. Protective effect of triterpenoid fractions from the rhizomes of *Astilbe chinensis* on cyclophosphamide-induced toxicity in tumor-bearing mice. *J. Ethnopharmacol.* 119:312–317.
102. Sun SY. 2010. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol. Ther.* 9: 109–110.
103. Takano F, Tanaka T, Aoi J, Yahagi N, Fushiya S. 2004. Protective effect of (+)-catechin against 5-fluorouracil-induced myelosuppression in mice. *Toxicology* 201:133–142.
104. Trainor KJ, Morley AA. 1976. Screening of Cytotoxic Drugs for Residual Bone Marrow Damage. *J. Natl. Cancer Inst.* 57:1237–1239.
105. Travlos GS. 2006. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.* 34:548–565.
106. Udupa KB, Lipschitz DA. 1989. The pattern of myeloid suppression and recovery after the addition of methotrexate to murine long-term bone marrow culture. *Leuk. Res.* 13:667–672.
107. Vacek A, Barnet K, Hofer M, Cech K, Pekák J, Schneiderová H. 1997. Stimulation of hemopoietic colony formation from mouse marrow cells in vitro using human dialyzable leukocyte extracts-immodin-sevac. *Int. J. Immunopharmacol.* 19:431–436.
108. Vacek A, Hofer M, Barnet K, Cech K, Pekárek J, Schneiderová H. 2000. Positive effects of dialyzable leukocyte extract (DLE) on recovery of mouse

haemopoiesis suppressed by ionizing radiation and on proliferation of haemopoietic progenitor cells in vitro. *Int. J. Immunopharmacol.* 22:623–634.

109. Vemula S, Shi J, Mali RS, Ma P, Liu Y, Hanneman P, Koehler KR, Hashino E, Wei L, Kapur R. 2012. ROCK1 functions as a critical regulator of stress erythropoiesis and survival by regulating p53. *Blood* 120:2868–2878.
110. Welsch U, Sobotta J. 2009. *Histología*. Ed. Médica Panamericana. Estados Unidos: Indianapolis, pp. 106-107.
111. Weydert CJ, Cullen JJ. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat. Protoc.* 5:51–66.
112. Wilson A, Laurenti E, Trumpp A. 2009. Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19:461–468.
113. Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. 2005. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312:424–431.
114. Yamauchi A, Kawabe J, Kabara M, Matsuki M, Asanome A, Aonuma T, Ohta H, Takehara N, Kitagawa T, Hasebe N. 2013. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 maintains adhesion of endothelial progenitor cells and reduces neointima formation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305:1158-1167.
115. Yang ZF, Drumea K, Cormier J, Wang J, Zhu X, Rosmarin AG. 2011. GABP transcription factor is required for myeloid differentiation, in part, through its control of Gfi-1 expression. *Blood* 118:2243–2253.

116. Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G, Zou W. 2012. Bone marrow and the control of immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 9:11–19.
117. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. 2013. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. *Immunity* 39:74–88.
118. Zucker SN, Fink EE, Bagati A, Mannava S, Bianchi-Smiraglia A, Bogner PN, Wawrzyniak JA, Foley C, Leonova, KI, Grimm MJ, Moparthy K, Ionov Y, Wang J, Liu S, Sexton S, Kandel ES, Bakin AV, Zhang Y, Kaminski N, Segal BH, Nikiforov MA. 2014. Nrf2 Amplifies Oxidative Stress via Induction of Klf9. *Mol. Cell* 53:916–928.

12.- RESUMEN BIOGRÁFICO

Erika Evangelina Coronado Cerda

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: ACTIVIDAD QUIMIOPROTECTORA DEL IMMUNEPOTENT CRP
EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA CONTRA DEL DAÑO
INDUCIDO POR EL 5-FLUOROURACILO EN UN MODELO
MURINO

Campo de Estudios: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 6 de Octubre de 1987,
hija de Francisco Coronado Aguirre y Patricia Cerda Torres.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado
obtenido Cirujano Dentista en 2010. Egresada de la Universidad
Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Master en Ciencias con
Orientación en Inmunobiología en 2013.

Experiencia Profesional: Dentista de tiempo completo en un consultorio personal
de 2006 al 2011.

Research Article

***In Vivo* Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil**

Erika Evangelina Coronado-Cerda,¹ Moisés Armides Franco-Molina,¹ Edgar Mendoza-Gamboa,¹ Heriberto Prado-García,² Lydia Guadalupe Rivera-Morales,¹ Pablo Zapata-Benavides,¹ María del Carmen Rodríguez-Salazar,¹ Diana Caballero-Hernandez,¹ Reyes Silvestre Tamez-Guerra,¹ and Cristina Rodríguez-Padilla¹

¹Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), P.O. Box 46 "F", 66455 San Nicolás de los Garza, NL, Mexico

²Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan 4502, Colonia Sección XVI, 14080 Ciudad de México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Cristina Rodríguez-Padilla; crrodrig07@gmail.com

Received 21 December 2015; Accepted 27 March 2016

Academic Editor: Takami Sato

Copyright © 2016 Erika Evangelina Coronado-Cerda et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Chemotherapy treatments induce a number of side effects, such as leukopenia neutropenia, peripheral erythropenia, and thrombocytopenia, affecting the quality of life for cancer patients. 5-Fluorouracil (5-FU) is widely used as myeloablative model in mice. The bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) or IMMUNEPOTENT CRP[®] (ICRP) is an immunomodulatory compound that has antioxidants and anti-inflammatory effects. In order to investigate the chemoprotection effect of ICRP on bone marrow cells in 5-FU treated mice, total bone marrow (BM) cell count, bone marrow colony forming units-granulocyte/macrophage (CFU-GM), cell cycle, immunophenotypification, ROS/superoxide and Nrf2 by flow cytometry, and histological and hematological analyses were performed. Our results demonstrated that ICRP increased BM cell count and CFU-GM number, arrested BM cells in G0/G1 phase, increased the percentage of leukocyte, granulocytic, and erythroid populations, reduced ROS/superoxide formation and Nrf2 activation, and also improved hematological levels and weight gain in 5-FU treated mice. These results suggest that ICRP has a chemoprotective effect against 5-FU in BM cells that can be used in cancer patients.

1. Introduction

Most of chemotherapeutic agents can cause myelosuppression in a dose-dependent manner [1]. Other side effects of chemotherapy are alopecia, stomatitis, immunosuppression, anorexia, nausea, and vomiting which result in a decreased functional capacity and quality of life for cancer patients [2]. 5-Fluorouracil (5-FU) is a chemotherapeutic agent used to treat gastrointestinal, breast, pancreatic, and head and neck

cancer, among others [3]. The mechanism of cytotoxicity of 5-FU has been ascribed to the misincorporation of fluoronucleotides into RNA and DNA and to the inhibition of the nucleotide synthetic enzyme thymidylate synthase [4]. 5-FU distributes readily into bone marrow, small intestine, kidney, liver, and spleen [5, 6]. In the bone marrow 5-FU, it is incorporated in the DNA and induces oxidative stress, which is partly responsible for myelotoxicity [7, 8]. It is well known that patients treated with 5-FU are cursed

with neutropenia, mucositis, leukopenia, and hematological toxicity [9, 10]. Because of these side effects, chemoprotective compounds have been used to reduce these problems [11–19]. Bovine dialyzable leukocyte extract or IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) is a dialysate of a heterogeneous mixture of low-molecular-weight substances released from disintegrated leukocytes of the blood or lymphoid tissue obtained from homogenized bovine spleen. ICRP was capable of stimulating the immune system in patients with non-small cell lung cancer and increasing their quality of life [20]. Also, *in vitro* studies demonstrated that ICRP was an effective therapeutic agent in process involving oxidative cellular damage and clinical inflammatory diseases, through $\text{I}\kappa\text{B}/\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathway [21]. In this study, we examined the protector effect of ICRP on myelosuppression caused by 5-FU in a mouse model.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. Nine-week-old male Balb/c mice were obtained from the bioterium of the Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas. The mice were maintained on pelleted food and water *ad libitum* and housed in controlled environmental conditions (25°C and a 12h light/dark cycle). The protocol for the animal study was approved by Ethic Review Committee for Animal Experimentation of the Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

2.2. Reagents. 5-Fluorouracil (5-FU) (Fluorox®) was purchased from Lemery (Mexico). N-Acetylcysteine (NAC) was obtained from Sandoz Pharmaceuticals (Mexico). IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) was produced by the Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL (San Nicolás de los Garza, Nuevo León, Mexico). ICRP is a low-molecular-weight product (10–12 kDa) from bovine spleen. The extract is dialyzed, lyophilized, and determined as pyrogen-free by *Limulus of amoebocyte* lysate assay (Endotoxin detection kit, ICN Biomedical, Aurora, OH, USA). The ICRP obtained from 1×10^8 leukocytes is defined as one unit (1 U).

2.3. Experimental Design. Mice were randomly divided into 5 groups as follows:

Control: injected *i.p.* on day 0 and *i.m.* for 6 consecutive days with the vehicle (deionized water).

5-FU: injected *i.p.* with 5-FU in a single dose of 75 mg/kg.

NAC + 5-FU: injected *i.p.* with NAC in a single dose of 250 mg/kg and one hour later with 5-FU *i.p.* in a single dose of 75 mg/kg as a positive protection control [7].

ICRP: injected *i.m.* with ICRP (5 U) for 6 consecutive days.

ICRP + 5-FU: injected *i.m.* with ICRP (5 U), one hour later with 5-FU *i.p.* in a single dose of 75 mg/kg, and for the 6 consecutive days with ICRP (5 U) per day.

The animals were sacrificed on day 1 and day 7 to perform the experiments.

2.4. Preparation of Bone Marrow (BM) Cell Suspension. After the mice were sacrificed, both femurs and tibias were dissected. Bone marrow cells were flushed with 5 mL of Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) and supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), antimetabolic, and antibiotics. Cells suspensions were centrifuged at 1600 rpm for 10 min and washed twice in IMDM. Final suspension was used for total bone marrow cell count, bone marrow colony forming units-granulocyte/macrophage (CFU-GM) assay, cell cycle, and flow cytometric analysis.

2.5. Total BM Cell Count. After the cells were pooled from both femurs and tibias, a count was done by trypan blue exclusion technique, which helps us exclude dead cells from viable cells. To calculate the number of cells obtained from each mouse, 50 μL of the cell suspension was taken and this was transferred to 400 μL of medium plus 50 μL of trypan blue; 10 μL of this suspension was taken and placed in the Neubauer chamber (Bright Line, Reichert, USA). Observation was performed under a microscope at 10x and viable cells present were counted.

2.6. CFU-GM Assay. A total of 1×10^6 BM cells were resuspended in 1 mL IMDM supplemented with 2% of FBS, and then 300 μL of this suspension was added to 3 mL of mouse methylcellulose complete media (R&D Systems). Subsequently, the mixture was collected with a 3 mL syringe and 1.1 mL of the final mixture was placed in a 35 mm diameter culture dish; this was done in duplicate. The incubation of dishes was performed according to the manufacturer's instructions. The formation of colonies was observed by microscopy, and the total number of colonies in each dish was counted.

2.7. Cell Cycle Analysis. The staining procedures were performed using a BD Cycle Test Plus DNA Reagent Kit according to the instructions of the manufacturer. Cell cycle phase distributions were analyzed in Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). In addition, the percentage of cells in each phase of cell cycle was analyzed by FlowJo software (Treestar, Inc., San Carlos, CA).

2.8. Flow Cytometric Analysis. For immunophenotyping, BM cells were stained using fluorescent label-conjugated anti-CD71, anti-ter119, anti-CD45, anti-CD11b, and anti-Gr-1 antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA). For intracellular staining, NRF2 (D1Z9C) XP® Rabbit mAb (PE Conjugate) was used, following the technique provided by the manufacturer. For measure of oxidative stress, Total ROS/Superoxide detection kit was used (Enzo Life Sciences). The stained cells were analyzed by Accuri C6 flow cytometer and CFlow plus software (BD Biosciences, San Jose, CA).

2.9. Histopathological Analysis. The left femoral bone of each mouse was prepared for general histopathological evaluation, including fixation, decalcification, and sectioning (4 μm thickness), as well as hematoxylin and eosin (HE) staining. Histopathological analysis was done by a veterinarian pathologist.

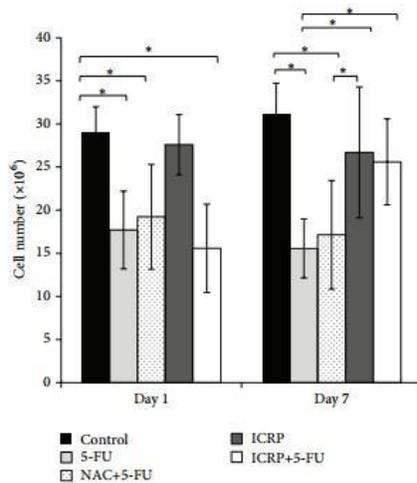


FIGURE 1: Total bone marrow cell count: BM cells from both femurs and tibias were obtained on day 1 and day 7 from treated mice. Subsequently, BM cells were counted by trypan blue dye exclusion * ($P < 0.05$) ($n = 3$).

2.10. Hematological Analysis. Blood collection was done by cardiac puncture in EDTA containing vials for immediate analysis of hematological parameters. Hematological analysis was determined by standard clinical procedures using an automatic hematological analyzer (COULTER® Ac-T diff™ Analyzer, Beckman Coulter).

2.11. Weight Gain. Measurement of weight in grams of the mice was performed at the beginning of treatment and seven days later. Weight gain was calculated by subtracting the final weight minus initial weight.

2.12. Statistical Analysis. Data was presented as mean \pm SD and statistically analyzed using one-way ANOVA test followed by Tukey multiple comparison posttest at $P < 0.05$ ($n = 3$) using SPSS v17 software.

3. Results

3.1. ICRP Restores the Number and Function of BM Cells in 5-FU Treated Mice. The evaluation of the total number of BM cells and the number of CFU-GM was performed 1 and 7 days after the initiating treatment. The number of total BM cells was significantly ($P < 0.05$) decreased in all the groups treated with 5-FU at day 1. Seven days later, the ICRP + 5-FU group showed a recovery compared to 5-FU ($P < 0.05$) and NAC + 5-FU groups. On the other hand, the use of ICRP treatment by itself did not change, compared to the control (Figure 1).

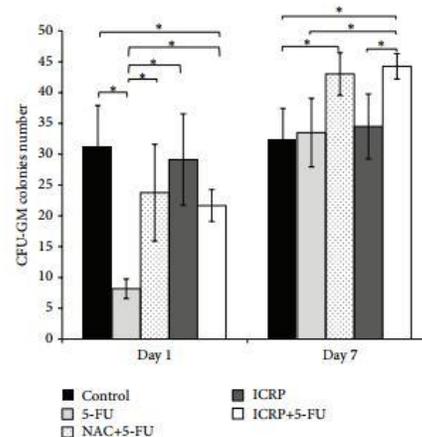


FIGURE 2: Colony forming units-granulocyte/macrophage (CFU-GM) assay: BM cells from both femurs and tibias were obtained on day 1 and day 7 from treated mice. Subsequently, BM cells were grown mouse methylcellulose complete media in a 5% CO₂ incubator for 14 days and colonies were counted * ($P < 0.05$) ($n = 3$).

When the evaluation of the number of CFU-GM was done, we observed that ICRP and NAC treatments reversed the side effects of 5-FU related to a decrease in the number of CFU-GM colonies ($P < 0.05$) on day 1; seven days later, NAC + 5-FU and ICRP + 5-FU groups increased the number of CFU-GM compared to the control (Figure 2).

3.2. ICRP Does Not Affect Cell Cycle Phases on BM Cells in 5-FU Treated Mice. Treatment with 5-FU significantly decreased S phase and NAC and ICRP treatments did not change this effect on BM cells. The 5-FU group increased the percentage of Sub-G1 phase, which indicates that cells are under apoptosis, on day 1. The cell cycle was not affected ($P < 0.05$) by treatments on day 7 (Table 1).

3.3. ICRP Restores Leukocyte, Granulocyte, and Erythrocyte Populations in BM Cells of 5-FU Treated Mice. To elucidate the specific population that is protected by the ICRP, the percentages of leukocyte (CD45⁺), granulocytic (CD11b⁺Gr-1⁺), and erythroid (CD71, Ter119) lineages in BM cells were evaluated by flow cytometry. On day one, leukocyte and granulocytic populations were decreased ($P < 0.05$) by 5-FU treatment; NAC and ICRP did not protect BM cells of 5-FU treated mice. The 5-FU group evaluated on day 7 kept low percentages of CD45⁺ and CD11b⁺Gr-1⁺ populations but ICRP + 5-FU group increased these populations ($P < 0.05$) similar to the control group (Figure 3).

The protective effect of ICRP on erythroid lineage was evident on days 1 and 7, because ICRP + 5-FU group preserves highest percentages in basophilic erythroblast and orthochromatic erythroblast stages of erythroid maturation

TABLE 1: Effects of 5-FU, NAC + 5-FU, ICRP, and ICRP + 5-FU treatments on cell cycle phases in mice.

	Groups	Cell cycle phases%			
		G0/G1	S	G2/M	Sub-G1
Day 1	Control	71.97 ± 2.80	21.27 ± 1.93	4.32 ± 0.77	2.00 ± 0.27
	5-FU	85.13 ± 3.25 ^a	7.92 ± 1.03 ^a	3.21 ± 1.06	4.10 ± 1.34 ^a
	NAC + 5-FU	86.10 ± 1.93 ^a	7.40 ± 0.15 ^a	3.18 ± 0.52	3.67 ± 0.57
	ICRP	71.33 ± 2.26 ^{b,c}	21.67 ± 1.46 ^{b,c}	4.17 ± 1.31	3.20 ± 0.30
	ICRP + 5-FU	89.53 ± 0.31 ^{a,d}	6.15 ± 0.75 ^{a,d}	2.86 ± 0.89	3.19 ± 0.99
Day 7	Control	79.27 ± 1.95	15.87 ± 1.80	4.94 ± 1.21	2.51 ± 1.09
	5-FU	66.57 ± 11.05	22.47 ± 6.76	5.82 ± 1.57	7.37 ± 3.48
	NAC + 5-FU	70.30 ± 0.95	25.03 ± 0.70	6.56 ± 2.53	2.12 ± 0.73
	ICRP	73.80 ± 7.71	18.27 ± 3.95	8.17 ± 4.09	4.69 ± 1.65
	ICRP + 5-FU	67.40 ± 2.72	21.70 ± 4.52	8.34 ± 5.52	5.12 ± 3.63

Data are expressed as mean ± SD ($P < 0.05$) ($n = 3$).

a: significantly different from the control group.

b: significantly different from 5-FU group.

c: significantly different from NAC + 5-FU group.

d: significantly different from ICRP group.

TABLE 2: Effects of 5-FU, NAC + 5-FU, ICRP, and ICRP + 5-FU on erythrocyte population in treated mice.

	Groups	Erythrocyte population%			
		I Proerythroblasts	II Basophilic erythroblasts	III Orthochromatic erythroblast	IV Enucleated red blood cells
Day 1	Control	0.53 ± 0.06	49.00 ± 2.65	6.60 ± 0.46	25.17 ± 1.07
	5-FU	0.07 ± 0.12 ^a	40.07 ± 4.56 ^a	3.50 ± 0.20 ^a	31.03 ± 2.57 ^a
	NAC + 5-FU	0.23 ± 0.06	39.67 ± 3.28 ^a	5.50 ± 0.30 ^{ab}	26.93 ± 2.93
	ICRP	0.30 ± 0.00 ^b	51.80 ± 0.36 ^{b,c}	6.50 ± 0.30 ^{b,c}	20.53 ± 0.45 ^{b,c}
	ICRP + 5-FU	0.20 ± 0.10	57.03 ± 2.59 ^{b,c}	4.20 ± 0.26 ^{a,c,d}	20.20 ± 1.55 ^{a,b,c}
Day 7	Control	0.33 ± 0.05	48.3 ± 1.95	3.10 ± 0.87	20.57 ± 2.48
	5-FU	0.27 ± 0.11	1.70 ± 0.26 ^a	3.50 ± 0.88	71.87 ± 4.48 ^a
	NAC + 5-FU	4.40 ± 2.40 ^{ab}	27.3 ± 5.66 ^b	6.67 ± 1.52 ^{ab}	21.63 ± 3.3 ^b
	ICRP	0.63 ± 0.05 ^c	51.9 ± 3.93 ^{b,c}	4.90 ± 0.40	20.77 ± 4.31 ^b
	ICRP + 5-FU	4.13 ± 0.77 ^{a,b,d}	52.1 ± .59 ^{b,c}	6.83 ± 0.70 ^{ab}	16.30 ± 1.57 ^b

Data are expressed as mean ± SD ($P < 0.05$) ($n = 3$).

a: significantly different from the control group.

b: significantly different from 5-FU group.

c: significantly different from NAC + 5-FU group.

d: significantly different from ICRP group.

Populations I to IV represent progressive maturation of erythroid cells. Populations are characterized by I, proerythroblasts; II, basophilic erythroblasts; III, orthochromatic erythroblast; and IV, enucleated red blood cells.

compared with 5-FU group ($P < 0.05$). Enucleated red blood cells were the predominant population in 5-FU treated mice; these findings are different to the control and ICRP + 5-FU groups (Figure 4 and Table 2).

3.4. ICRP Decreased ROS/Superoxide Formation and Nrf2 Activation Induced by 5-FU. The ROS/superoxide formation and Nrf2 activation were induced on day 1 and day 7 by 5-FU treatment and the ICRP + 5-FU treatment decreases these

parameters on day 7; no statistical difference was found on day 1 (Figure 5).

3.5. Histopathologic Analysis. The effect of ICRP on the histopathology of bone marrow at 1 and 7 days is shown in Figure 6 and described at continuation; 5-FU treatment decreased the cell density of bone marrow, creating a hypocellular environment, with marked decrease of megakaryocytes and granulocytic lineage cells, and no large amount of

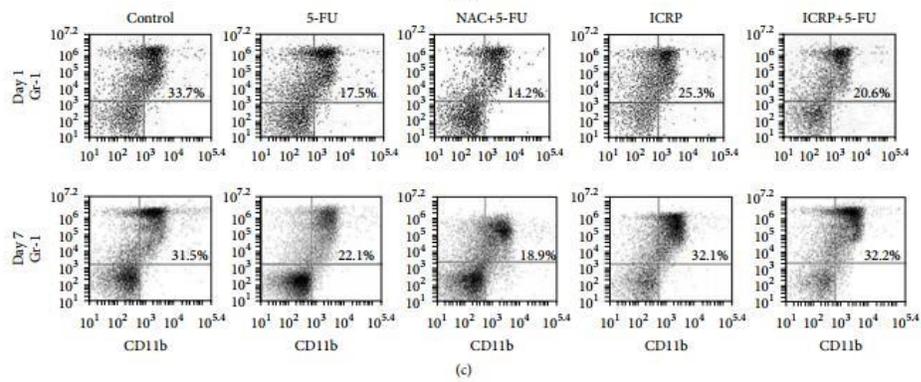
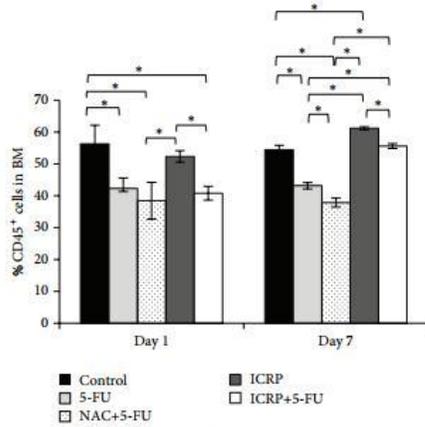
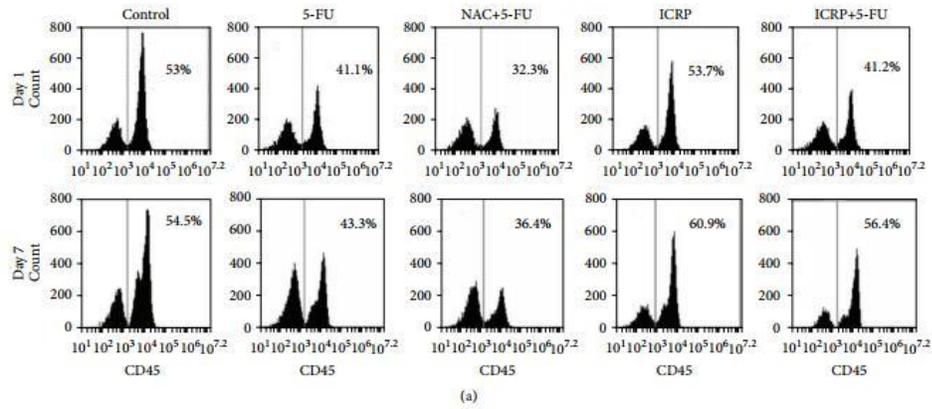


FIGURE 3: Continued.

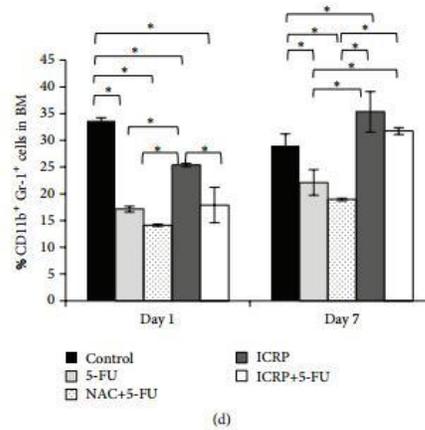


FIGURE 3: Flow cytometry analysis: BM cells from both femora and tibia were obtained on day 7 from treated mice. Subsequently, BM cells were analyzed for expression of the cell surface markers by flow cytometry. (a) Representative result of flow cytometry analysis for CD45⁺ BM cells. (b) Statistics from CD45⁺ BM cells. (c) Representative result of flow cytometry analysis for CD11b⁺Gr-1⁺ BM cells. (d) Statistics from CD11b⁺Gr-1⁺ BM * ($P < 0.05$) ($n = 3$).

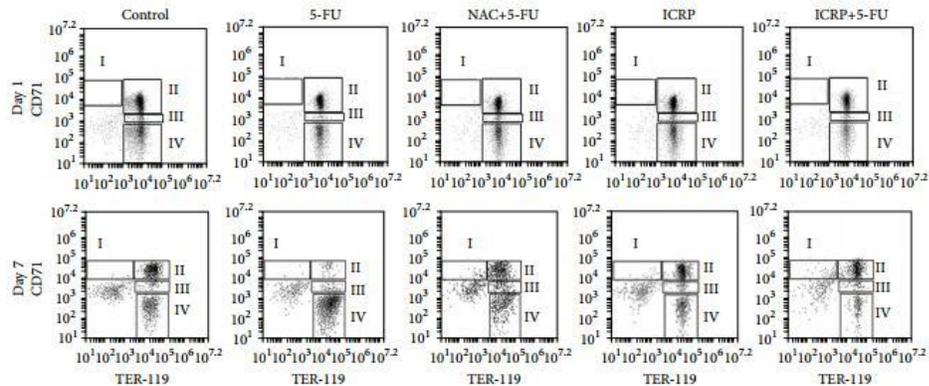


FIGURE 4: Flow cytometry analysis: representative result of flow cytometry analysis. BM cells from both femurs and tibias were obtained on day 7 from treated mice. Subsequently, BM cells were analyzed for expression of the cell surface markers CD71 and Ter119 by flow cytometry. Populations I to IV represent progressive maturation of erythroid cells. Populations are characterized by I, proerythroblasts; II, basophilic erythroblasts; III, orthochromatic erythroblast; and IV, enucleated red blood cells.

precursor cells was found. NAC and ICRP treatments protect bone marrow because they present a higher proportion in differentiated precursor cells and cellularity. The ICRP group showed normal myeloid tissue cellularity.

3.6. Effects of ICRP on Hematotoxicity and Gain of Body Weight in 5-FU Treated Mice. We examined the effects of ICRP on 5-FU treated mice on red blood cell (RBC),

hemoglobin (HB), hematocrit (HCT), white blood cell (WBC), and platelets (PLT) levels 1 and 7 days after initiating treatments. The 5-FU group resulted in anemia and erythrocytopenia and decreased the hematocrit level on day 1 and day 7. The leucopenia was observed only in day 1. The ICRP + 5-FU group did not present any of these toxic effects; their values were similar to the control group (Table 3). The 5-FU treated mice gained less body weight ($P < 0.05$) compared to

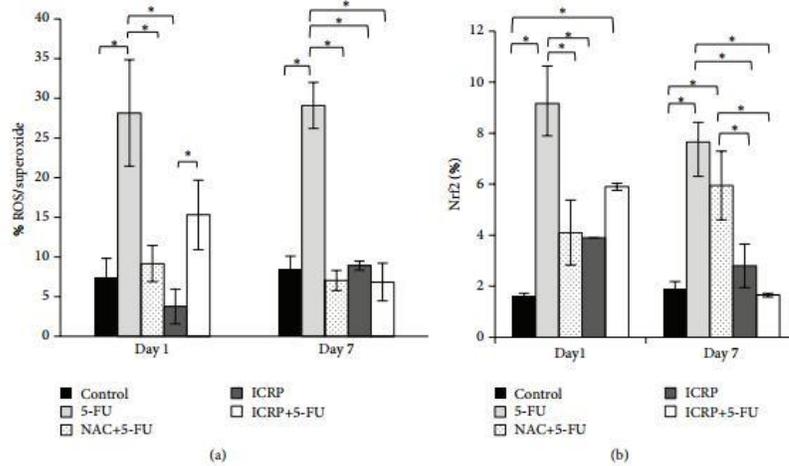


FIGURE 5: (a) ROS/superoxide analysis: BM cells from both femora and tibia were obtained on day 1 and day 7 from treated mice. Subsequently, BM cells were stained for ROS/superoxide detection by flow cytometry. (b) Nrf2 analysis: BM cells from both femora and tibia were obtained on day 1 and day 7 from treated mice. Subsequently, BM cells were fixed and permeabilized for intracellular staining * ($P < 0.05$) ($n = 3$).

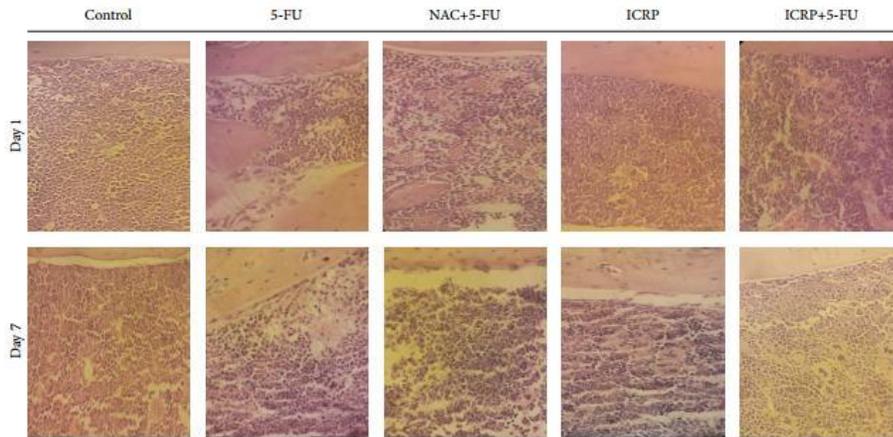


FIGURE 6: Bone marrow histology: on day 1 and day 7, femora of treated mice were harvested, fixed, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. The histological description was made by a pathologist; photographs were taken under a microscope at 40x.

the control. The ICRP + 5-FU group increased body weight similar to the control group (Table 4).

4. Discussion

The chemotherapy with 5-FU is widely used since its discovery to treat a variety of tumors, including colorectal, breast,

and liver carcinomas [22]. The hematologic toxicity induced by chemotherapy is related to the dose-limiting side effect, affecting the therapeutic success and quality of life of patients [23]. The 5-FU as a model of bone marrow depletion has been used by many researchers [7, 13, 16, 17, 24–28]; in the present study, we corroborated that a single dose of 5-FU

TABLE 3: Effects of 5-FU, NAC + 5-FU, ICRP, and ICRP + 5-FU on peripheral blood analysis in treated mice.

Group	Peripheral blood analysis					
	RBC count $\times 10^6$	HB level g/dL	HCT level (%)	WBC mm^3	PLT mm^3	
Day 1	Control	8.00 \pm 0.35	12.50 \pm 0.85	36 \pm 4	4.67 \pm 0.49	534.33 \pm 170.28
	5-FU	4.43 \pm 0.31 ^a	6.87 \pm 0.61 ^a	20 \pm 2 ^a	1.50 \pm 0.44 ^a	318.33 \pm 123.31
	NAC + 5-FU	6.97 \pm 0.81 ^b	11.30 \pm 1.39 ^b	32 \pm 5 ^b	2.23 \pm 0.85	393.00 \pm 54.29
	ICRP	8.30 \pm 0.44 ^b	13.10 \pm 0.72 ^b	39 \pm 2 ^b	6.37 \pm 1.77 ^{b,c}	448.67 \pm 108.84
	ICRP + 5-FU	6.90 \pm 1.14 ^b	11.03 \pm 1.61 ^b	32 \pm 5 ^b	4.13 \pm 0.91	472.33 \pm 159.53
Day 7	Control	7.60 \pm 0.92	11.63 \pm 1.65	34 \pm 6	5.03 \pm 0.95	525.00 \pm 184.01
	5-FU	4.83 \pm 1.27 ^a	7.73 \pm 2.48 ^a	22 \pm 7	3.13 \pm 1.90	260.67 \pm 122.92
	NAC + 5-FU	6.93 \pm 0.59 ^b	10.50 \pm 0.95	32 \pm 3	5.60 \pm 3.74	380.00 \pm 34.18
	ICRP	8.63 \pm 0.15 ^b	13.43 \pm 0.50 ^b	42 \pm 5 ^b	6.27 \pm 1.87	470.67 \pm 82.78
	ICRP + 5-FU	7.73 \pm 0.35 ^b	12.17 \pm 0.45 ^b	36 \pm 2 ^b	4.57 \pm 1.10	600.00 \pm 89.21 ^b

Data are expressed as mean \pm SD ($P < 0.05$) ($n = 3$).

a: significantly different from the control group.

b: significantly different from 5-FU group.

c: significantly different from NAC + 5-FU group.

Red blood cell (RBC), hemoglobin (HB), hematocrit (HCT), white blood cell (WBC), and platelets (PLT).

TABLE 4: Effects of 5-FU, NAC + 5-FU, ICRP, and ICRP + 5-FU on body weight gain in treated mice.

Group	Body weight		
	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)
Control	26.50 \pm 3.00	29.75 \pm 2.63	3.25 \pm 0.50
5-FU	24.00 \pm 4.62	25.25 \pm 4.35	1.25 \pm 0.50 ^a
NAC + 5-FU	23.50 \pm 5.20	25.25 \pm 5.06	1.75 \pm 0.50 ^a
ICRP	25.50 \pm 4.51	29.00 \pm 4.97	3.50 \pm 0.58 ^{b,c}
ICRP + 5-FU	25.75 \pm 3.59	28.75 \pm 4.03	3.00 \pm 0.82 ^b

Data are expressed as mean \pm SD ($P < 0.05$) ($n = 3$).

a: significantly different from the control group.

b: significantly different from 5-FU group.

c: significantly different from NAC + 5-FU group.

(75 mg/kg) reduces the number of CFU-GM [7], which indicates that bone marrow lineage commitment and proliferative potential are affected [29]. The ICRP treatment demonstrates an efficient chemoprotection to 5-FU treatment, due to an increase in bone marrow progenitor cells function, such as those found with the use of amifostine, which is a clinical radioprotector [30].

This effect on progenitor cells can be correlated with the capacity of ICRP to protect more committed lineages in bone marrow cells, such as leukocyte (CD45⁺), granulocyte (CD11b⁺Gr-1⁺), and erythroid populations (CD71, Ter119) which are affected by 5-FU [27, 31], and also with normal hematological values of WBC and RBC in a systemic level. Other studies have previously used animal models and peripheral blood reconstitution as measure of bone marrow recovery after chemotherapy [32, 33]. These results could be used to reduce infections and anemia experienced by patients receiving chemotherapy [34].

In this study, cell cycle analysis was used to determine whether the observed chemoprotection is related to cell cycle arrest at any phase. It is known that the mechanism of cytotoxicity of 5-FU is on actively proliferating cells (S phase) including healthy and cancer cells [35, 36]. Agents such as

tetrapeptide acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) and TGF- β can protect marrow progenitor cells due to the induction of G0/G1 arrest, being an alternative to chemoprotection therapy [37, 38]. In our study, ICRP and NAC did not affect cell cycle in bone marrow cells, suggesting another mechanism of action in the protection of 5-FU treated bone marrow cells.

It is known that 5-FU induces oxidative stress in bone marrow cells [7] and this leads to the activation of Nrf2 transcription factor [39, 40]; therefore, several researchers explain the mechanism of chemoprotection of different compounds for their ability to activate the antioxidant response and neutralizing ROS [41]. Our results indicate that ICRP decreased ROS/superoxide production and Nrf2 activation in 5-FU treated bone marrow cells on 7 day; this could be explained because ICRP has an antioxidant capacity by increasing glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase enzymes [21]; further studies are needed to clarify whether these enzymes are responsible for decreasing ROS production in bone marrow. These results would suggest that ICRP might act as free radical scavenger, similar to amino thiols and phosphorothioates, two protective agents widely used [42].

All these effects of chemoprotection are reflected in our histopathology analysis; this kind of technique is used to assess the bone marrow architecture, cellularity, estimation of iron stores, and other features [43]. It is important that patients receiving chemotherapy can maintain their weight in order to improve health-related quality of life [44]; we found that ICRP helps to maintain normal weight after 5-FU treatment, which indicates that ICRP could improve the quality of life in cancer patients. It is known that NAC protects the cytotoxic and apoptotic effects against cisplatin in human tumor cell lines, because NAC blocks the death receptor and mitochondrial apoptotic pathways [45]. This is necessary in *in vitro* and *in vivo* studies to determine if ICRP has antagonist action against tumor cells treated with chemotherapy due to its antioxidant activity showed in this study. Current studies about that are running in our laboratory. Although in previous studies ICRP has been administered to patients with breast and lung cancer as an adjuvant to avoid secondary effects in combination with chemotherapy, there was no effect on the tumor regression and improving the quality of life [20, 46].

5. Conclusion

It is important to investigate new compounds that could be given during chemotherapy treatment and help us to alleviate some side effects, resulting in a significant increase in chemotherapy doses. Our results suggest that the ICRP can be proposed as a chemoprotective agent because it is able to protect the damage caused by 5-FU in bone marrow cells, ROS production, hematological parameters, and weight gain probably by its antioxidant or immunomodulatory capacity.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, in collaboration with "Red Temática de Inmunología en Cáncer y Enfermedades Infecciosas" with registry no. 253053, CONACYT.

References

- [1] Y. Wang, V. Probin, and D. Zhou, "Cancer therapy-induced residual bone marrow injury: mechanisms of induction and implication for therapy," *Current Cancer Therapy Reviews*, vol. 2, no. 3, pp. 271–279, 2006.
- [2] J. E. Groopman and L. M. Itri, "Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, no. 19, pp. 1616–1634, 1999.
- [3] A. Polk, K. Vistisen, M. Vaage-Nilsen, and D. L. Nielsen, "A systematic review of the pathophysiology of 5-fluorouracil-induced cardiotoxicity," *BMC Pharmacology & Toxicology*, vol. 15, p. 47, 2014.
- [4] D. B. Longley, D. P. Harkin, and P. G. Johnston, "5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 330–338, 2003.
- [5] M. Chadwick and C. Chang, "Comparative physiologic dispositions of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 5-fluorouracil in mice bearing solid L1210 lymphocytic leukemia," *Cancer Treatment Reports*, vol. 60, no. 7, pp. 845–855, 1976.
- [6] S. Tetsuhiko, "Development history and concept of an oral anticancer agent S-1 (TS-1): its clinical usefulness and future vistas," *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 39, no. 1, pp. 2–15, 2009.
- [7] S. Numazawa, K. Sugihara, S. Miyake et al., "Possible involvement of oxidative stress in 5-fluorouracil-mediated myelosuppression in mice," *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, vol. 108, no. 1, pp. 40–45, 2011.
- [8] J. D. Schuetz, H. J. Wallace, and R. B. Diasio, "5-Fluorouracil incorporation into DNA of CF-1 mouse bone marrow cells as a possible mechanism of toxicity," *Cancer Research*, vol. 44, no. 4, pp. 1358–1363, 1984.
- [9] M. B. Garg, L. F. Lincz, K. Adler, F. E. Scorgie, S. P. Ackland, and J. A. Sakoff, "Predicting 5-fluorouracil toxicity in colorectal cancer patients from peripheral blood cell telomere length: a multivariate analysis," *British Journal of Cancer*, vol. 107, no. 9, pp. 1525–1533, 2012.
- [10] K. Kadoyama, I. Miki, T. Tamura, J. B. Brown, T. Sakaeda, and Y. Okuno, "Adverse event profiles of 5-fluorouracil and capecitabine: data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system, AERS, and reproducibility of clinical observations," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 9, no. 1, pp. 33–39, 2012.
- [11] A. R. A. Abd-Allah, A. A. Al-Majed, A. A. Al-Yahya, S. I. Fouda, and O. A. Al-Shabana, "L-carnitine halts apoptosis and myelosuppression induced by carboplatin in rat bone marrow cell cultures (BMC)," *Archives of Toxicology*, vol. 79, no. 7, pp. 406–413, 2005.
- [12] Y. Yang, S. Xu, Q. Xu et al., "Protective effect of Dammarane Sapogenins against chemotherapy-induced myelosuppression in mice," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 236, no. 6, pp. 729–735, 2011.
- [13] S. Kojima, K. Takaba, N. Kimoto et al., "Protective effects of glutathione on 5-fluorouracil-induced myelosuppression in mice," *Archives of Toxicology*, vol. 77, no. 5, pp. 285–290, 2003.
- [14] E.-S. M. El-Sayed, A.-A. H. Abdel-Aziz, G. K. Helal, S. Saleh, and A. S. Saad, "Protective effect of N-acetylcysteine against carmustine-induced myelotoxicity in rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 6, pp. 1576–1580, 2010.
- [15] B. Das, R. Antoon, R. Tsuchida et al., "Squalene selectively protects mouse bone marrow progenitors against cisplatin and carboplatin-induced cytotoxicity in vivo without protecting tumor growth," *Neoplasia*, vol. 10, no. 10, pp. 1105–1119, 2008.
- [16] B.-E. Jeong, E.-J. Ko, and H.-G. Joo, "Cytoprotective effects of fucoidan, an algae-derived polysaccharide on 5-fluorouracil-treated dendritic cells," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 5, pp. 1480–1484, 2012.
- [17] H. R. B. Raghavendran, R. Sathyanath, J. Shin et al., "Panax ginseng modulates cytokines in bone marrow toxicity and myelopoiesis: ginsenoside Rg1 partially supports myelopoiesis," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, Article ID e33733, 2012.
- [18] E.-S. M. El-Sayed, A.-A. H. Abdel-Aziz, S. Saleh, and A. S. Saad, "The chemopreventive effect of dimethylthiourea against carmustine-induced myelotoxicity in rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 9, pp. 1965–1969, 2011.

- [19] M. S. Becker, P. Schmezer, R. Breuer et al., "The traditional Chinese medical compound Rocaglamide protects nonmalignant primary cells from DNA damage-induced toxicity by inhibition of p53 expression," *Cell Death and Disease*, vol. 5, Article ID e1000, 2014.
- [20] M. A. Franco-Molina, E. Mendoza-Gamboa, P. Zapata-Benavides et al., "IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients," *Cytotherapy*, vol. 10, no. 5, pp. 490–496, 2008.
- [21] M. A. Franco-Molina, E. Mendoza-Gamboa, D. F. Miranda-Hernández et al., "Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 5, no. 22, pp. 3726–3736, 2011.
- [22] J. L. Grem, "5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development," *Investigational New Drugs*, vol. 18, no. 4, pp. 299–313, 2000.
- [23] S. Brenning, N. Lachmann, T. Buchegger, M. Hetzel, A. Schambach, and T. Moritz, "Chemoprotection of murine hematopoietic cells by combined gene transfer of cytidine deaminase (CDD) and multidrug resistance 1 gene (MDR1)," *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 34, article 148, 2015.
- [24] M. Hofer, M. Pospíšil, V. Znojil, J. Holá, A. Vacek, and D. Štreitová, "Adenosine A3 receptor agonist acts as a homeostatic regulator of bone marrow hematopoiesis," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 61, no. 6, pp. 356–359, 2007.
- [25] A. B. Kriegler, D. Bernardo, and S. M. Verschoor, "Protection of murine bone marrow by dexamethasone during cytotoxic chemotherapy," *Blood*, vol. 83, no. 1, pp. 65–71, 1994.
- [26] L. Comte, V. Lorgeot, J. Bignon et al., "In vivo modifications of AcSDKP metabolism and haematopoiesis in mice treated with 5-fluorouracil and Goralatide," *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 28, no. 10, pp. 856–863, 1998.
- [27] F. Takano, T. Tanaka, J. Aoi, N. Yahagi, and S. Fushiya, "Protective effect of (+)-catechin against 5-fluorouracil-induced myelosuppression in mice," *Toxicology*, vol. 201, no. 1–3, pp. 133–142, 2004.
- [28] C. Sarkar, D. Chakroborty, P. S. Dasgupta, and S. Basu, "Dopamine is a safe antiangiogenic drug which can also prevent 5-fluorouracil induced neutropenia," *International Journal of Cancer*, vol. 137, no. 3, pp. 744–749, 2015.
- [29] S. Sheikhzadeh, H. J. Hammers, D. Hartwig, H. Kirchner, and P. Schlenke, "Improvement of the precision in CFU-GM and BFU-E counting by flow cytometry-based standardization of short-term culture assays," *Journal of Hematology and Stem Cell Research*, vol. 10, no. 6, pp. 881–885, 2001.
- [30] M. Orditura, F. De Vita, A. Roscigno et al., "Amifostine: a selective cytoprotective agent of normal tissues from chemoradiotherapy induced toxicity (Review)," *Oncology Reports*, vol. 6, no. 6, pp. 1357–1362, 1999.
- [31] S. Vemula, J. Shi, R. S. Mali et al., "ROCK1 functions as a critical regulator of stress erythropoiesis and survival by regulating p53," *Blood*, vol. 120, no. 14, pp. 2868–2878, 2012.
- [32] C. Hartley, S. Elliott, C. G. Begley et al., "Kinetics of hematopoietic recovery after dose-intensive chemo/radiotherapy in mice: optimized erythroid support with darbepoetin alpha," *British Journal of Haematology*, vol. 122, no. 4, pp. 623–636, 2003.
- [33] K. Bhaskara Udupa and D. A. Lipschitz, "The pattern of myeloid suppression and recovery after the addition of methotrexate to murine long-term bone marrow culture," *Leukemia Research*, vol. 13, no. 8, pp. 667–672, 1989.
- [34] S. Lindkaer-Jensen, S. Larsen, N. Habib-Lindkaer-Jensen, and H. E. Efgertun, "Positive effects on hematological and biochemical imbalances in patients with metastatic breast cancer stage IV, of BP-Cl, a new anticancer substance," *Drug Design, Development and Therapy*, vol. 9, pp. 1481–1490, 2015.
- [35] C. Focaccetti, A. Bruno, E. Magnani et al., "Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ros production in endothelial cells and cardiomyocytes," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 2, Article ID e0115686, 2015.
- [36] T. Shirasaka, "Development history and concept of an oral anticancer agent S-1 (TS-1®): its clinical usefulness and future vistas," *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 39, no. 1, pp. 2–15, 2009.
- [37] D. Bonnet, R. Césaire, F. Lemoine, M. Aoudjane, A. Najman, and M. Guigon, "The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of the cell-cycle status for normal human hematopoietic progenitors, has no effect on leukemic cells," *Experimental Hematology*, vol. 20, no. 2, pp. 251–255, 1992.
- [38] Y. Shiotsu, K. Yamashita, F. Kanai et al., "Chemoprotective effects of KF41399, a derivative of carbazole compounds, on nimustine-induced thrombocytopenia," *Blood*, vol. 95, no. 12, pp. 3771–3780, 2000.
- [39] H. Akhdar, P. Loyer, C. Rauch, A. Corlu, A. Guillouzo, and F. Morel, "Involvement of Nrf2 activation in resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer HT-29 cells," *European Journal of Cancer*, vol. 45, no. 12, pp. 2219–2227, 2009.
- [40] K. Kani, Y. Momota, M. Harada et al., "γ-tocotrienol enhances the chemosensitivity of human oral cancer cells to docetaxel through the downregulation of the expression of NF-κB-regulated anti-apoptotic gene products," *International Journal of Oncology*, vol. 42, no. 1, pp. 75–82, 2013.
- [41] Q. Ma and K. Kinneer, "Chemoprotection by phenolic antioxidants. Inhibition of tumor necrosis factor α induction in macrophages," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 4, pp. 2477–2484, 2002.
- [42] A. D. Schweitzer, E. Revskaya, P. Chu et al., "Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 78, no. 5, pp. 1494–1502, 2010.
- [43] G. S. Travlos, "Normal structure, function, and histology of the bone marrow," *Toxicologic Pathology*, vol. 34, no. 5, pp. 548–565, 2006.
- [44] I. Imayama, C. M. Alfano, M. L. Neuhouser et al., "Weight, inflammation, cancer-related symptoms and health-related quality of life among breast cancer survivors," *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 140, no. 1, pp. 159–176, 2013.
- [45] Y. J. Wu, L. L. Muldoon, and E. A. Neuwelt, "The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 312, no. 2, pp. 424–431, 2005.
- [46] H. H. Lara, L. I. Turrent, E. N. Garza-Treviño, R. Tamez-Guerra, and C. Rodriguez-Padilla, "Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an adjuvant," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 1, no. 3, pp. 425–431, 2010.