

## HEMATOPOYESIS Y CASEÍNAS

Edelmiro Santiago Osorio  
Edgar Ledesma Martínez

### RESUMEN

Los factores de crecimiento hematopoyético, miembros de la familia de las citocinas, son los principales moduladores de la hematopoyesis, sin embargo, existen evidencias de que moléculas diferentes a las citocinas también lo hacen. Un ejemplo es el ácido retinoico que hoy constituye la primera opción para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda. Tomando en cuenta que moléculas de caseína (principal proteína de la leche) y su sal el caseinato de sodio (CasNa) y algunos péptidos derivados de la degradación proteolítica de la caseína regulan la respuesta inmune, nuestro grupo aporta evidencias de que también regulan la hematopoyesis. Las caseínas y el CasNa bloquean la proliferación de líneas de células hematopoyéticas normales (32D) y leucémicas (WEHI-3). En las células 32D, el CasNa y la alfa-caseínas inducen la expresión del factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral alfa entre otras y este último es responsable en parte del bloqueo de la proliferación de las células 32D mediada por las caseínas. Algunas casomorfinas, péptidos bioactivos derivados de la caseínas, también bloquean la proliferación de las células 32D vía receptores opioides, ruta no empleada por las caseínas o CasNa. Este conjunto de datos indica que las caseínas o sus péptidos pueden modular la hematopoyesis, además de la respuesta inmune, por lo que es necesario profundizar los estudios sobre la participación de estas moléculas en algunas patologías relacionadas con la hematopoyesis, respuesta inmune y seguramente el sistema nervioso.

**Palabras clave:** *Hematopoyesis, citocinas, caseína, proliferación, péptidos.*

### Hemopoiesis and caseins

### ABSTRACT

Hemopoietic growth factors, members of the cytokine family, are the main hemopoiesis modulators, nevertheless, some experimental data point to the fact that different molecules apart from cytokines support these activities. A clear example is the retinoic acid that represents the first option for acute promyelocytic leukemia treatment. Taking into consideration that casein molecules (main protein in the milk) and its derivative salt, sodium caseinate (NaCas), and some peptides derived from proteolytic degradation of the casein molecule regulate the immune response, our research group show evidences that these molecules also regulate hemopoiesis. Casein and NaCas block efficiently proliferation of hemopoietic normal cells (32D) and leukemic cells (WEHI-3). In the 32D cell line, NaCas and alpha-caseins induce the macrophage-colony stimulating factor and the alpha tumor necrosis factor expression, and this factor is responsible, at least in part, of cell proliferation inhibition of 32D cells mediated by caseins. Casomorphins, bioactive peptides derived from caseins, also block cell proliferation of 32D cells acting through the opioid receptors, pathway that is not used for caseins or NaCas. All these data point to the fact that caseins or its derivative peptides can modulate hemopoiesis, along with the immune response, and in consequence is necessary to deepen studies about the participation of these molecules in some pathologies related with the hemopoiesis, the immune response, and perhaps the nerve system.

**Key Words:** *Hemopoiesis, citokines, casein, proliferation, peptides.*

ARTÍCULO RECIBIDO EL 08 DE NOVIEMBRE DEL 2005 Y ACEPTADO EL 21 DE NOVIEMBRE DEL 2005.

La hematopoyesis estudia los mecanismos celulares y moleculares que permiten generar mediante proliferación y diferenciación a las células sanguíneas a partir de una célula primitiva hematopoyética. La hematopoyesis es modulada por citocinas<sup>1,2</sup>, de entre ellas los factores de crecimiento hematopoyético como interleucina 3 (IL-3), factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF), de granulocitos (G-CSF), de macrófagos (M-CSF), eritropoyetina (EPO) y trombopoyetina (TPO), son suficientes para promover la proliferación y diferenciación de células precursoras hacia células mieloides maduras<sup>3</sup>, mientras que varias citocinas y quimiocinas originalmente reconocidas como reguladoras de procesos inflamatorios o inmunes, han mostrado efectos como supresores de la proliferación, entre ellas tenemos al factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), el interferón gama (IFN-gamma), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) y el ligando 3 de las CC quimiocinas también conocida como proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (CCL3/MIP-1 alfa)<sup>4</sup>. Sin embargo, existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta a las citocinas que afectan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, como por ejemplo el ácido retinoico (ATRA), miembro de la familia de las hormonas esteroideas<sup>5,6</sup>, el cual ha tenido gran impacto en la terapia de problemas hemato-oncológicos, concretamente es la primera elección para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda<sup>5</sup>. Lamentablemente el tratamiento de otro tipo de leucemia mieloides tiene un éxito reducido a pesar del uso de diferentes estrategias terapéuticas (altas dosis de quimioterapia, trasplante de médula ósea, inmunoterapia, o bloqueadores de blancos moleculares), y que constituyen un alto riesgo de daño a células normales<sup>7</sup>, por lo que sigue vigente la necesidad de estudiar a profundidad, cada una de las alternativas de modulación hematopoyética para facilitar una visión más integral de la biología básica de la hematopoyesis y detectar nuevas estrategias terapéuticas para solucionar problemas hemato-oncológicos.

La leche y los productos lácteos son componentes importantes de la dieta humana, aún en la etapa adulta, e históricamente se le ha valorado por su aporte nutricional<sup>8</sup>. La leche bovina está constituida por 3.6% de proteínas, 4.1% de grasas, 5.0% de carbohidratos, menos del 1% de vitaminas y minerales y 86.6% de agua. De la fracción proteica compuesta por alfa-lactalbúmina, beta-lactoglobulina y caseína, esta última es la principal componente con el 80% de la fracción<sup>9</sup>.

La caseína se encuentra incluida en forma de complejo salino, que al constituirse como partículas esféricas de dimensión no uniforme se les da el nombre de micelas. Está compuesta principalmente por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas como alfaS1-caseína, alfaS2-caseína, beta-caseína y kapa-caseína<sup>10</sup>.

La caseína es insoluble en agua sin embargo, al ser diluida en un álcali a pH 6.6 origina ciertos preparados solubles llamados caseinatos. El caseinato de sodio (CasNa) es producto de la disolución de la caseína en una solución de hidróxido de sodio,

seguido de evaporación hasta que la humedad se reduce a un 4%; tras lo cual se obtiene un polvo blanco o incoloro, soluble en agua y sin sabor<sup>9</sup>.

Tanto el caseinato de sodio (CasNa) como la caseína, debido a su alto valor nutricional se han empleado en la industria alimenticia como fuente de proteínas en cereales, productos dietéticos y en aquellos destinados para pacientes con diabetes<sup>9,10</sup>, sin embargo desde hace varios años se tienen indicios de que además de su importancia como fuente de aminoácidos, pueden modular la respuesta inmune y la hematopoyesis.

Estudios *in vivo* indican que la eliminación de caseína en la dieta de ratones reduce la producción de leucocitos, mientras que su adición reduce la mielosupresión<sup>11</sup>, por un lado se dan evidencias que tal efecto en la hematopoyesis se debe a la ausencia de aminoácidos<sup>12</sup>, mientras otros muestran que a pesar de la presencia de aminoácidos, la eliminación de caseína de la dieta conduce a una producción deficiente de la eritropoyetina en consecuencia existe reducción de la eritropoyesis<sup>13</sup>. Además la inyección intraperitoneal de CasNa en ratones induce la quimiotaxis de granulocitos y posteriormente de macrófagos al sitio de la infección aunado al incremento en la concentración en suero de actividad tipo factor estimulador de colonias de macrófagos y de granulocitos<sup>14</sup>, mientras que la caseína inyectada por esta misma vía induce la producción del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y de granulocito-macrófago (GM-CSF)<sup>15</sup>. Por su parte, la inyección subcutánea de caseína induce la producción de G-CSF pero no de TNF-alfa<sup>16</sup>, sin embargo aunque todas estas citocinas son importantes en la regulación de la hematopoyesis, no existen datos que indiquen que las caseínas efectivamente modulan la hematopoyesis *in vivo*.

Estudios *in vitro* revelan que la beta-caseína modula la respuesta inmune al activar la producción de radicales libres en granulocitos e induce la proliferación de linfocitos de carnero y la producción de anticuerpos<sup>17</sup>, también se tienen evidencias de que inducen la proliferación de linfocitos T en pacientes con diabetes tipo 1 y 2, por lo que se sugiere que podría estar relacionada con el desarrollo de la autoinmunidad en estos pacientes<sup>18</sup>.

En el campo de la hematopoyesis, estudios *in vitro* nos han permitido mostrar que el CasNa acelera la diferenciación de neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares en ratón<sup>19</sup>, reduce la proliferación e induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de las células 32D (una línea hematopoyética multipotencial dependiente de interleucina-3 y ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis normal en ratón)<sup>20</sup>, además induce la expresión de RNAm para el M-CSF y su receptor, incluso induce la liberación de proteína bioactiva de M-CSF en las células 32D<sup>21</sup>.

Por otro lado, también mostramos que la alfa, beta y kapa-caseína, al igual que el CasNa, bloquean la proliferación de las células 32D y de la línea leucémica mielomonocítica de ratón WEHI-3, aunque sólo las células 32D se diferencian hacia el

linaje monocito-macrófago y expresan RNAm para M-CSF y su receptor, y todas inducen la expresión en membrana del receptor del M-CSF (c-fms)<sup>22,23</sup>, mientras que solo el CasNa y en menor medida la alfa-caseína inducen la síntesis de proteína M-CSF y TNF-alfa<sup>24</sup>. Las células 32D y WEHI-3 son inducidas a expresar TGF-beta por la alfa-caseína, beta-caseína y kapa-caseína pero en mayor proporción por el CasNa, lo mismo ocurre con la inducción a la expresión de CCL3/MIP-1alfa excepto kapa-caseína que no lo induce<sup>24</sup>. De acuerdo a nuestros datos el CasNa tienen un potencial más amplio en la inducción de la diferenciación celular e inducción a la expresión de citocinas que las caseínas en la línea celular hematopoyética 32D y leucémica WEHI-3.

De todas las citocinas inducidas por CasNa en las células 32D, únicamente el TNF-alfa participa, aunque de manera marginal, en la supresión de la proliferación inducida por CasNa, mientras que no encontramos evidencias de que TNF-alfa, TGF-beta, CCL3/MIP-1alfa o incluso M-CSF, en forma individual sean responsables de la diferenciación hacia macrófagos, toda vez que a pesar de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra estas citocinas, las células 32D en presencia de CasNa aún sufren diferenciación<sup>24</sup>.

Aunque se ha mostrado que las moléculas completas de caseína regulan la hematopoyesis y algunas funciones inmunológicas, se han identificado péptidos derivados de las caseínas que también tienen propiedades antitrombóticas, antitumorales, inmunomoduladoras, antimicrobiales y antagonistas o agonistas opioides<sup>25</sup>. En este sentido, péptidos derivados de la kapa-caseína llamados casoplateínas actúan como antitrombóticos<sup>26</sup>, fragmentos de la alfa-caseína inhiben la proliferación bacteriana<sup>27</sup>, mientras que se ha identificado actividad antitumoral en los péptidos 90-95 de la alfa caseína y en los 60-64 de la beta-caseína designados por 90-95 alfa-casomorfina y 1-5 beta-casomorfina respectivamente, en tanto se ha reportado que la 1-7 beta-casomorfina derivada de la beta-caseína, es capaz de inhibir la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama y próstata<sup>28,29</sup>.

Por o anterior nuestro grupo de trabajo exploró el efecto de tres casomorfinas (90-95 alfa-casomorfina, 1-5 beta-casomorfina y 1-7 beta-casomorfina) en la proliferación y diferenciación de las células 32D y WEHI-3, encontramos que aún cuando la 1-5 beta-casomorfina reduce la proliferación en las células 32D pero no en WEHI-3 y la 1-7 beta-casomorfina lo hace ligeramente en ambas líneas, ninguna promueve la diferenciación macrófagica ya sea morfológica o por inducción a la expresión de antígenos específicos (c-fms)<sup>22</sup>.

Es conocido que las casomorfinas actúan mediante receptores opioides (receptores ampliamente expresados en células nerviosas)<sup>30</sup> e incluso se ha propuesto que la beta-caseína también utiliza esa vía<sup>17</sup>. El uso de naloxone, un antagonista opioide<sup>30</sup>, reveló que el efecto de las caseínas o el CasNa no fue modificado a excepción de la 1-5 beta-casomorfina en las células

32D. Esto indica que solo la 1-5 b-casomorfina modula la proliferación vía receptores opioides y que las células 32D tienen receptores opioides funcionales, pero que las caseínas y el CasNa no los usan para ejercer su función<sup>22</sup>, lo cual obliga a investigar la ruta de activación mediada por las caseínas.

El cúmulo de evidencias descritos en los párrafos previos indican que la alfa-, beta y kapa-caseína y su sal (CasNa) y algunos de sus fragmentos como la 1-7 b-casomorfina, aunque de forma diferencial pero todas afectan la hematopoyesis *in vitro*, lo cual obliga a profundizar el estudio del efecto biológico de estas diferentes moléculas no solo *in vitro* sino también *in vivo*, sobre todo si consideramos que durante la digestión de las caseínas por enzimas proteolíticas, se liberan péptidos, y luego otras peptidasas degradan estos péptidos en aminoácidos que son absorbidos por la mucosa intestinal, pero que algunos péptidos son resistentes a los procesos de hidrólisis y pueden ser absorbidos. Por ejemplo, la 1-7  $\beta$ -casomorfina fue detectada en el intestino delgado después de la ingestión de leche en humanos adultos<sup>31</sup>, y un precursor estable de este mismo péptido (Val-1-7  $\beta$ -casomorfina) fue localizado en el intestino delgado y en la sangre de corderos después de haberse suministrado de forma oral<sup>32</sup>, más recientemente en un estudio llevado por Chabance B, observó que en adultos humanos sanos, péptidos bioactivos son liberados en el estómago durante la digestión de leche o yogurt, y aunque el número y tamaño de estos péptidos disminuye entre el estómago y el duodeno, dos péptidos (uno derivado de la  $\alpha$ -s<sub>1</sub>, y otro de la  $\kappa$ -caseína) con actividad biológica potencial pasaron a la sangre<sup>33</sup>; además estudios *in vitro* han revelado que enzimas gastrointestinales tienen la capacidad de generar varios péptidos de la  $\beta$ -caseína con actividad opioide<sup>34</sup>. Esto indica que péptidos derivados de la leche resisten la degradación proteolítica en tracto digestivo y que algunos alcanzan torrente sanguíneo, lo cual sugiere que pueden tener efectos biológicos normales a nivel sistémicos, incluyendo la modulación hematopoyética *in vivo*, pero que también puede ser patológico ya que se tienen evidencia que en pacientes con autismo, la concentración de casomorfina es elevada y que al unirse a los receptores opioides provocan autismo, incluso la eliminación de caseína de la dieta parece reducir el cuadro patológico<sup>35</sup>. Por otro lado, se ha observado que la dieta con caseínas en ratones neonatos es indispensable para un eficiente desarrollo del sistema inmune de mucosas<sup>36</sup>, incluso se ha mostrado que el amamantamiento por mas de 6 meses reduce el riesgo de desarrollar leucemia mieloide y linfoide<sup>37</sup>, de acuerdo a nuestros datos, existe la posibilidad de que las caseínas o alguno de sus péptidos sea el responsable de este conjunto de actividades, donde la modulación de la hematopoyesis tiene un papel relevante.

Finalmente, es interesante que una proteína de la dieta común pueda tener efectos sistémicos diversos incluyendo al inmunológico y nervioso, sobre todo porque abre la posibilidad que por la vía alimenticia podamos modular la respuesta inmune con fines profilácticos e incluso terapéuticos, aunque para ello aún queda mucho camino por recorrer.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Socolovsky M, Constantinescu S, Bergelson S, Sirotkin A, Lodish H. Cytokines in hematopoiesis: Specificity and redundancy in receptor function. *Adv Protein Chem* 1998; 52:141-98.
2. Broxmeyer H, Kim C. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol*. 1999; 27:1113-23
3. Clark S, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987; 236: 1229.
4. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska A, Gewirtz M, Emerson S, Ratajczak M. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblast, erythroblast, and megakaryoblast and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 2001; 97: 3075.
5. Fenaux P, Chomienne C, Degos L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol* 2001; 38:13-25.
6. Dawson M, Elstner E, Kizaki M, Chen D, Pakkala S, Kerner B, and Koefler P. Myeloid differentiation mediated through retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RXR) not RXR/RXR pathway. *Blood* 1994; 84:446-452
7. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106: 1154-1163.
8. Koletzko B, Aggett P, Bindels J, Bong P, Ferre P et al. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British J Nutrition* 1998; 80, Suppl 1, S5-S45.
9. Walstra P, Jenner R. Dairy chemistry and physics. Ed. Jhon Wiley Sons, New York, USA. 106 pp.
10. Meisel H. Biochemical Properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 1997; 43:119-128.
11. Aschkenasy A. Influence of certain antimetabolites (aminopterin, 6-mercaptopurine, prednisolone and chloramphenicol) on the restoration of lymphopoiesis after an experimental nitrogen inanition. *Seances Soc Biol Fil* 1968; 19:652-7.
12. Aschkenasy A. Effets comparés de la caséine et de divers melanges amino-acides sur la restauration de lérythropoïèse, de la neutropoïèse et de la lymphopoïèse chez des rats préparés par une privation prolongée de protéines. *Nouvelles études. Arch Sci Physiol* 1971; 25:415-430
13. Okano M, Ohnota H, Sasaki R. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J Nutr* 1992;122:1376-83
14. Lotem J, and Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer* 1985; 35:93-100.
15. Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S, Di Rago L. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood* 1996; 88: 3755-3764.
16. Noursadeghi M, Bickerstaff MCM, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys MB. Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J Immunol* 2002; 169:913-919.
17. Wong C, Seow H, Liu A, Hunsband A, Smithers G, et al. Modulation of immune responses by bovine b-casein. *Immunol cel Biol* 1996; 74:323-9.
18. Cavallo MG, Fava D, Monettini L, Barone F, Pozzilli P. Cell mediated immune response to b-casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet* 1996; 348:926-928.
19. Bautista M. Efecto de factores activadores y diferenciadores sobre el granulocito-neutrófilo en banda: Diferenciación, fragmentación del ADN y producción de M-CSF. Tesis Licenciatura, FES Zaragoza, UNAM. 1998.
20. Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Invest Clin* 2000; 52:638-44.
21. Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. Sodium caseinate induces the murine multipotent myeloid cell line 32D to express and secrete the macrophage colony stimulating factor (M-CSF). *Arch Med Res* 2004a; 35: 109-113.
22. Ramos G. Efecto de caseínas y casomorfínas en la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mieloides 32D y WEHI-3. Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias Biológicas, FES-Zaragoza, UNAM. 2004b.
23. Melo B. Modulación de la expresión de genes del linaje monocito-macrófago (fcgammara, m-csf, gm-csf y sus receptores) en células mieloides tratadas con caseínas. Tesis de Licenciatura, Facultad e Ciencias, UNAM. 2004.
24. Ledesma E, Cordova Y, Weiss B, Garcia A, Santiago E. El caseinato de sodio (CasNa) induce la producción de TNF-a TGF-B y MIP-1a, en la línea celular 32D. XLVI Jornada Anual Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, A.C. Querétaro, Querétaro, México. Mayo 4-8, 2005.
25. Meisel H and Bockelmann W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999; 76: 207-215.
26. Jolles P, Levy-Toledano S, Fiat AM, Soria C., Guillens D, Thomaidis A. Analogy between fibrinogen effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *Eur J Biochem* 1996; 158: 379-382.
27. Zucht HD, Raida M, Adermann K, Magert HJ, Forssmann WG. Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett*. 1995; 372: 185-8.
28. Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Martin P, and Castanas E. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human  $\alpha_{s1}$ -casein ( $\alpha_{s1}$ -casomorphin, and  $\alpha_{s1}$ -casomorphin amide). *Biochem J* 1996; 319:903-908.
29. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martin PM, Castanas E. Antiproliferative and receptor binding properties of  $\alpha$ - and  $\beta$ -casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol* 1996; 310:217-223.

30. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kampa M, Panagiotou S, Martin PM, et al. Somatostatin and opioid receptors in mammary tissue. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480:53-63.
31. Svedberg J, DeHans J, Leimenstoll, Teschemacher H. Demonstration of  $\beta$ -casomorphin immunoreactive materials in vitro digests of bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides Fayetteville* 1985; 6:825-830.
32. Read L, Lord A, Brantl V, Koch G. Absorption of b-casomorphins from autoperfused lamb and piglet small intestine. *Am J Physiol* 1990; 259:6443-6452.
33. Chabance B, Marteau P, Rambaud J, Samour M, Boynard M, et al. Casein peptide and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 1998; 80:155-165.
34. Jinsmaa Y, Yoshikawa M. Enzymatic release of neocasomorphin and  $\beta$ -casomorphin from bovine  $\beta$ -casein. *Peptides* 1999; 20:957-962.
35. Reichelt KL, Knivsberg AM. Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides?. *Nutr Neurosci* 2003; 6: 19-28.
36. Silva JM, Sousa DM, Carmona DC, Alvarez-Leite JI, Russo M, Monteiro NV, Faria AMC. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol* 2003; 15: 447-455.
37. Shu XO, Linet MS, Steinbuch M, Wen WQ, Buckley JD, Neglia JP, Potter JD, Reaman GH, Robison LL. Breast-feeding and risk of childhood acute leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1765-72.