



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFFECTO DE CASEÍNAS Y CASOMORFINAS EN LA
PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS LÍNEAS
CELULARES MIELOIDES 32D Y WEHI-3

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
GERARDO RAMOS MANDUJANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MÉXICO, D. F.



OCTUBRE, 2004

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFEECTO DE CASEÍNAS Y CASOMORFINAS EN LA
PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE
LAS LÍNEAS CELULARES MIELOIDES
32D Y WEHI-3

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

GERARDO RAMOS MANDUJANO

DIRECTOR DE TESIS: Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2004



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de junio del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno GERARDO RAMOS MANDUJANO con número de cuenta 94619302, con la tesis titulada: "EFECTO DE CASEÍNAS Y CASAMORFINAS EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES MIELOIDES 32D Y WEHI-3.", bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Presidente:	Dr. Benny Weiss Steider
Vocal:	Dr. Héctor Mayani Viveros
Vocal:	Dra. María Genoveva González Morán
Vocal:	Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas
Secretario:	Dr. Edelmiro Santiago Osorio
Suplente:	Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta
Suplente:	Dr. Jorge Meléndez Zajgla

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de septiembre del 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), FES Zaragoza U.N.A.M. Bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio y la supervisión del comité tutorial conformado por los Doctores: Héctor Mayani Viveros, Luis Felipe Jiménez García y Enrique I. Miranda Peralta.

Durante la realización de la presente tesis se contó con el apoyo del Programa de Becas para Estudios de Posgrado del CONACYT (Registro No. 149905) y del Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado UNAM.

El trabajo recibió el Apoyo a Proyectos de Investigación para Tesis Doctoral UNAM (PAEP 201325).

Además, la realización de la investigación fue apoyada por los proyectos PAPIIT IN213397, IN215199 e IN203501 de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA, UNAM).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por permitirme trabajar en su laboratorio

A los doctores Héctor Mayani Viveros, Luis Felipe Jiménez García y Enrique I. Miranda Peralta por su asesoramiento durante el desarrollo de la presente tesis

A los integrantes del jurado, Dra. María Genoveva González Morán, Dr. Jorge Meléndez Zajgla, Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas y Dr. Benny Weiss Steider, por sus comentarios y sugerencias

Agradecer a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gerardo Ramos

Blanciana

FECHA: 06-00-09

FIRMA: 

DEDICATORIA

A BEATRIZ MANRIQUE GUTIÉRREZ

POR TODA SU PACIENCIA, APOYO Y COMPAÑÍA

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
1. RESUMEN	1
1.1. ABSTRACT.....	2
2. INTRUDUCCIÓN	3
2.1. HEMATOPOYESIS	3
Células hematopoyéticas	3
Células tallo hematopoyéticas	4
Células progenitoras hematopoyéticas	4
Células hematopoyéticas precursoras y maduras	5
Regulación de la hematopoyesis	9
Componente celular	10
Componente proteico	11
Alteraciones en la regulación de la hematopoyesis	17
2.2. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LAS CASEÍNAS	18
Propiedades generales	18
Actividades biológicas	18
2.3. PÉPTIDOS BIACTIVOS DERIVADOS DE LAS CASEÍNAS	21
Actividades generales	21
Actividad en leucocitos	22
Presencia fisiológica	24
2.4. CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS Y PÉPTIDOS OPIOIDES	26
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4. OBJETIVOS GENERALES.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODO	31
5.1. LÍNEAS CELULARES.....	31
5.2. CITOCINAS Y ANTICUERPOS	31
5.3. CULTIVOS EN PRESENCIA DE CasNa, CASEÍNAS Y CASOMORFINAS.....	31
5.4. OBJETIVO 1.....	32
Proliferación	32

Viabilidad	32
Diferenciación	33
5.5. OBJETIVO 2	34
5.6. OBJETIVO 3	34
5.7. MANEJO Y PRESENTACIÓN DE DATOS	37
6. RESULTADOS	38
6.1. OBJETIVO 1. Evaluar sí el CasNa, la α -, β - y κ -caseína, así como la 90-95 α -casomorfina, 1-5 β -casomorfina y 1-7 β -casomorfina alteran la proliferación e inducen diferenciación de la línea mieloide multipotencial 32D y de la línea de leucemia mielomonocítica WEHI-3.....	38
Proliferación	38
Viabilidad	42
Diferenciación	46
6.2. OBJETIVO 2. Evaluar sí el efecto de los derivados de la caseína y de las casomorfinas en las células hematopoyéticas en estudio es mediado por receptores opioides	65
6.3. OBJETIVO 3. Evaluar la posible intervención de algún factor de crecimiento hematopoyético (FCH) en los efectos observados, en las células hematopoyéticas utilizadas	70
7. DISCUSIÓN	79
7.1. OBJETIVO 1	79
7.2. OBJETIVO 2	84
7.3. OBJETIVO 3	86
8. PERSPECTIVAS	88
9. CONCLUSIONES	90
10. ANEXO 1	91
11. BIBLIOGRAFÍA	93
12. PUBLICACIONES	106

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albúmina sérica bovina
CAM	Molécula de adhesión celular
CasNa	Caseinato de sodio
Célula NK	Célula natural asesina
CD	Grupo de diferenciación
CFU-	Unidades formadoras de colonias de
CH	Célula hematopoyética
CPH	Célula progenitora hematopoyética
CSF-	Factor estimulador de colonias de
CTH	Célula tallo hematopoyética
ST-HSC	CTH-reconstituyente a corto plazo
LT-HSC	CTH-reconstituyente a largo plazo
DC	Célula dendrítica
DEPEC	Dietilpirocarbonato
ELISA	Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas
Epo	Eritropoyetina
FITC	Isotiosianato de fluoresceína
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
3H	Metil ³ -
IFN	Interferón
IL-	Interleucina-
rmIL-3	Interleucina-3 recombinante de ratón
IMDM	Medio Iscove s Modified Dulbecco s
JAK	Janus cinasa
LSP	Linfocitos de sangre periférica
MC	Medio condicionado
M-CSFR	Receptor del M-CSF
MEC	Matriz extracelular
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MPP	Progenitor pluripotente
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio
NLX	Naloxone

OPD	o - fenilenediamina
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos
PI	Fosfatidil inositol
Rb	Retinoblastoma
RC	Receptor de citocina
RO	Receptor opioide
RTK	Receptor tirosina cinasa
RT-PCR	Retrotranscripción ligada a la reacción en cadena de la polimerasa
SCF	Factor de células seminales
SDF-1	Quimiocina derivada de células estromales-1
SE	Suero de equino
SFB	Suero fetal bovino
SH2	Homólogo a Scr-2
STATs	Transductores de señal y activadores de la transcripción
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tpo	Trombopoyetina

1. RESUMEN

En las dos últimas décadas se ha mostrado que las caseínas y algunos péptidos obtenidos de su proteólisis, presentan actividades biológicas y un potencial impacto en la salud. En lo que respecta a células hematopoyéticas, hasta la fecha, sólo se han reportado sus efectos en células maduras normales, como neutrófilos, macrófagos y linfocitos, por lo que no se conocen sus implicaciones en la hematopoyesis normal o leucémica. Por lo tanto, en el presente estudio, se evaluó el efecto de las caseínas, el caseinato de sodio (CasNa) y de tres casomorfina, sobre la proliferación y diferenciación de la línea celular mieloide 32D y de la línea leucémica WEHI-3.

Se encontró que el CasNa y las caseínas, disminuyen la proliferación e inducen diferenciación al linaje monocito-macrófago de las células 32D. En la línea leucémica WEHI-3, reducen la proliferación pero no inducen diferenciación. Con respecto a las casomorfina, la 1-5 β -casomorfina reduce la proliferación de las células 32D, pero no de las células WEHI-3, mientras que sólo la dosis más alta de 1-7 β -casomorfina disminuye ligeramente la proliferación de las dos líneas celulares, pero ninguna de las casomorfina promovió la diferenciación.

También determinamos que el CasNa y las caseínas en las células 32D y WEHI-3, no actúan vía receptores opioides (RO's), como se ha reportado para algunas células hematopoyéticas con derivados de la caseína, sin embargo, en la acción de la 1-5 β -casomorfina en las células 32D sí intervienen los RO's, por lo que proponemos la presencia y funcionalidad de RO's en estas células. Finalmente, al evaluar la presencia de algún factor de crecimiento hematopoyético en los cultivos de las células 32D en presencia de CasNa, determinamos que se induce la expresión y secreción de M-CSF, así como de su receptor (M-CSFR) en estas células. Este resultado sumado a la diferenciación observada, podría sugerir un mecanismo autócrino/parácrino en donde el M-CSF producido sea el responsable del efecto del CasNa en las células 32D, sin embargo, los resultados indicaron que el M-CSF no participa en la reducción de la proliferación, por lo que su participación puede ser secundaria o solo intervenir en la diferenciación.

Nuestros resultados muestran que las caseínas y las casomorfina pueden regular la hematopoyesis normal y leucémica *in vitro*, por lo que nuestro trabajo abre la posibilidad de que este tipo de compuestos también tengan efectos *in vivo*, y surge la necesidad de determinar sus posibles aplicaciones terapéuticas en desordenes hematológicos.

1.1. ABSTRACT

In the last two decades several studies have shown that caseins and various peptides obtained from their enzymatic proteolysis have important biological activities and therefore a potential impact in health. With regards to hematopoietic cells, only recently several publications have published the effects of caseins and casomorphins on mature cells like neutrophils, macrophages and lymphocytes, however their impact on normal or leukemic hemopoietic cells is still not known. In consequence in the present study we evaluated the effects of caseins, sodium caseinate (CasNa) and three different casomorphins on the proliferation and differentiation of the myeloid progenitor 32D cells and the myelomonocytic leukemia WEHI-3 cell line.

We found that CasNa and the caseins reduced the proliferation and induced differentiation of the 32D cells to the monocyte-macrophage lineage, and reduced the proliferation but did not induce differentiation of WEHI-3 cells. The 1-5 β -casomorphin reduced the proliferation of 32D cells but not that of WEHI-3 cells. While only high doses of 1-7 β -casomorphin slightly decreased the proliferation of both cell lines. Neither of them induced differentiation.

We also present evidence that the activity of CasNa and caseins in 32D and WEHI-3 cells is not due to interactions with opioid receptors (OR's), as it has been reported for some hematological cells with casein derivatives. However, we observed that the action of 1-5 β -casomorphin on 32D cells could be mediated by OR's, thus we propose the presence of other types of OR's in these cells.

Finally, when we evaluated the presence of hematopoietic growth factors in the culture media of 32D cells with CasNa, we detected a activity type CSF. We also showed that CasNa indeed induced the expression and secretion of M-CSF, as well as of its receptor (M-CSFR) on these cells. Our results could have hinted that the differentiation of 32D cells with CasNa could be mediated by a autocrine/paracrine mechanism where the M-CSF induced by CasNa could be responsible of the observed effects, nevertheless our results showed that M-CSF by itself could not reduce the proliferation of these cells. Therefore the role of the induced M-CSF may be as a secondary growth inhibitor or to participate exclusively with differentiation.

Our results show that caseins and casomorphins can regulate normal and leukemic hemopoiesis *in vitro*, thus our work opens the possibility for these class of compounds to have also an *in vivo* effect in normal and malignant hemopoiesis, and thus to study its possible therapeutic applications in haematological disorders.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. HEMATOPOYESIS

Para reemplazar a las células sanguíneas perdidas en los eventos fisiológicos normales, el organismo produce cada día billones de leucocitos, eritrocitos y plaquetas. Además, en situaciones de stress como sangrado o infección, existe un rápido y significativo incremento en la generación de células maduras. El proceso de producción de células sanguíneas y su homeostasis es llamado hematopoyesis. En el adulto, la hematopoyesis se lleva a cabo principalmente en la médula ósea, a partir de un número relativamente reducido de células tallo y progenitoras hematopoyéticas.

Células hematopoyéticas

Las células hematopoyéticas son divididas en tres compartimientos principales. Las células seminales o tallo pluripotentes, que dan origen a diversas poblaciones de células progenitoras multi- y monopotentes, y éstas a su vez originan a las diferentes células precursoras y maduras. El paso de una población a otra es una trayectoria irreversible, en la que las células incrementan su número y sufren una diferenciación y maduración, pero progresivamente disminuyen su potencialidad y su capacidad de auto-renovación (Figura 1) (Quesenberry et al, 2002; Metcalf, 1999).

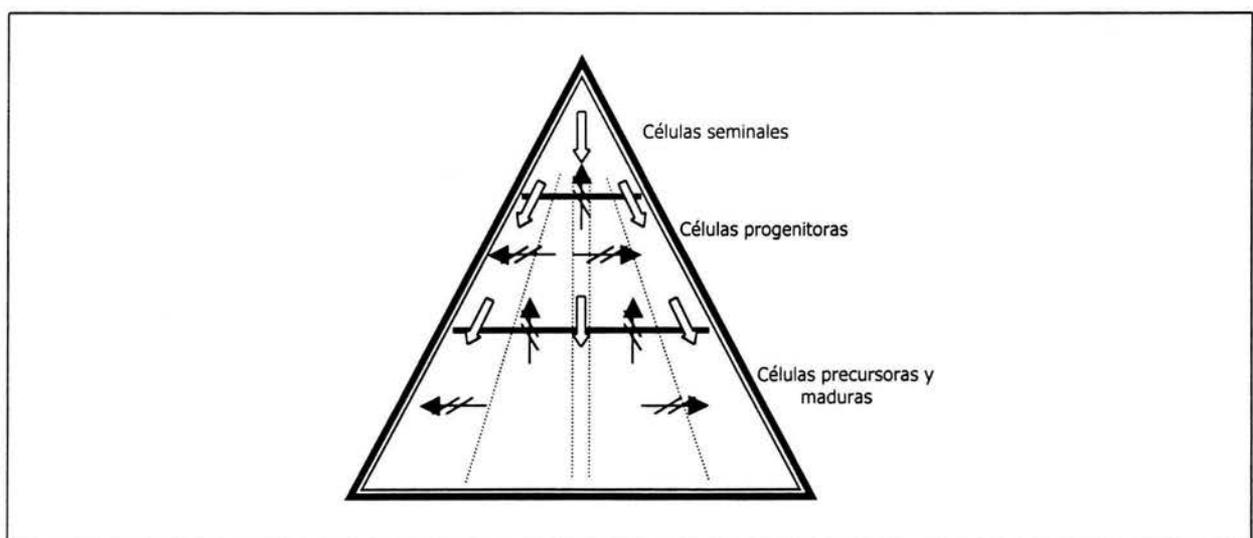


Figura 1. Visión general de las poblaciones de células hematopoyéticas. Las células de cada compartimiento generan un número relativamente mayor de células del compartimiento siguiente, en un proceso irreversible en el cual las células comprometidas a un linaje no puede cambiar su comprometimiento a otro linaje. (Tomado de Metcalf, 1999).

Células tallo hematopoyéticas

Las células tallo hematopoyéticas (CTH s) son células pluripotentes, es decir tienen la capacidad de originar todos los linajes sanguíneos, y representan menos del 0.01% de las células mononucleadas en la médula ósea. Fenotípicamente, son células pequeñas con poco citoplasma y no expresan marcadores de superficie de células sanguíneas maduras, pero expresan otros marcadores como Thy-1, Sca-1 y CD34 (Reya et al, 2001; Bonnet, 2002). En condiciones normales la mayoría de las CTH s se encuentran quiescentes (fase G₀ del ciclo celular) y sólo se dividen para mantener los niveles de la hematopoyesis en el organismo (Szilvassy et al, 2000).

Los estudios de trasplante en modelos murinos a corto y largo plazo, y el empleo de anticuerpos, han permitido el aislamiento de al menos dos clases de CTH s. Las CTH s-reconstituyentes a largo plazo (LT-HSC por sus siglas en inglés, long-term hematopoietic stem cells) con inmunofenotipo en el ratón Thy1.1^{lo}Lin⁻Sca⁺c-kit⁺, las cuales tienen una alta capacidad de auto-renovación, y reconstituyen la hematopoyesis para toda la vida en ratones previamente irradiados. Las CTH s-reconstituyentes a corto plazo (ST-HSC por sus siglas en inglés, short-term hematopoietic stem cells) con inmunofenotipo Thy1.1^{lo}Lin⁻Mac^{lo}Sca⁺c-kit⁺, que retienen la capacidad de auto-renovación y reconstitución de la hematopoyesis por aproximadamente 8 semanas (Morrison y Weissman, 1994). Además, se reporta la existencia de una población de progenitores pluripotentes (MPP s) con inmunofenotipo Thy1.1^{lo}Lin⁻Sca⁺c-kit⁺Mac^{lo}CD4^{lo}, sin la capacidad de auto-renovación, pero que directamente originan todos los linajes sanguíneos, a través de una serie de células progenitoras intermedias (Weissman 2000). Por lo tanto, una posible jerarquización de las células pluripotentes quedaría de la siguiente manera LT-HSC→ST-HSC→MPP (figura 2) (Weissman et al, 2001).

Células progenitoras hematopoyéticas

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH s) derivadas de las CTH s, pierden su capacidad de auto-renovación y pluripotencialidad, pero adquieren la suficiente capacidad proliferativa para generar la gran cantidad células sanguíneas maduras requeridas. Se ha reportado la existencia de dos tipos de CPH s multilinaje; un progenitor común de linfocitos con inmunofenotipo Lin⁻IL-7R⁺Thy1.1⁻Sca1^{lo}c-kit^{lo}, restringido a linfocitos T, B y células NK (Kondo et al, 1997; Akashi et al, 2000a), y un progenitor común

mieloeritroide con inmunofenotipo Lin⁻IL-7R⁻Sca1^{c-kit}FcγR^{lo}CD34⁺ restringido a granulocitos, macrófagos, megacariocitos y eritrocitos (Akashi et al, 2000b; Ling y DzierzaK, 2002).

Cuando los progenitores multilinaje son estimulados apropiadamente, generan colonias en cultivos semi-sólidos, por lo que son conocidos como unidades formadoras de colonias (CFU s-). Estas incluyen CFU-GM, CFU-Ba, CFU-Eo, CFU-E, CFU-MK, CFU-preB y CFU DC para unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos, linfocitos-B y células dendríticas, respectivamente (Kondo et al, 1997; Akashi et al, 2000b) (figura 2). Los clones que crecen en los cultivos *in vitro* son de un sólo linaje y no exhiben características aberrantes; por ejemplo, gránulos eosinófilos en células eritroides, aun cuando las colonias sean el resultado de la estimulación con un factor multilinaje, esto argumenta la unidireccionalidad en el comprometimiento de cada linaje y los subsecuentes eventos de maduración.

Células hematopoyéticas precursoras y maduras

En las etapas finales, las células han sufrido una dramática especialización promovida por las fases de diferenciación. En estas etapas, los distintos precursores pueden ser identificados mediante tinciones morfológicas y además, existe una notable o total disminución en su capacidad proliferativa (Bondurant y Koury, 1999). Al madurar los precursores dan origen a las células sanguíneas circulantes, este compartimiento contiene varios tipos de células completamente distintas en apariencia y con funciones específicas (Munker et al, 2000) (figura 2).

Eritrocitos: Más del 95% del componente proteico citoplasmático del eritrocito es la proteína transportadora de oxígeno hemoglobina, el resto incluye a algunas enzimas requeridas para la producción de energía y el mantenimiento de la hemoglobina en un estado funcional. A pesar de la pérdida de organelos citoplasmáticos como núcleo, mitocondria o ribosomas, los eritrocitos tienen una vital y compleja función en el transporte de oxígeno a los tejidos y removiendo bióxido de carbono del cuerpo (Telen y Kaufman, 1999; Kendall, 2001).

Megacariocitos y plaquetas: Las plaquetas se forman de la fragmentación del megacariocito. Las plaquetas tienen un esencial papel en la homeóstasis, en la trombosis

y en la coagulación de la sangre. Éstas, se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos dañados para impedir la pérdida de sangre, a través de una serie de pasos discretos que involucran su adhesión al área lesionada, además, las plaquetas sufren rápidos cambios morfológicos, tales como la extensión de pseudópodos, agregación y secreción de gránulos (Stenberg y Hill, 1999; Kaushansky, 1999).

Granulocitos: Los granulocitos, son así llamados porque tienen gránulos en su citoplasma que se tiñen densamente, también son llamados leucocitos polimorfonucleares por la forma del núcleo. Existen tres tipos de granulocitos; los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos, todos tienen una vida relativamente corta, y son producidos en grandes números durante la respuesta inmune. Los neutrófilos, se adhieren y avanzan sobre la superficie luminal de las células endoteliales, y se mueven a través del tejido hacia el sitio de daño. Una vez que arriban paran sus movimientos, y entonces, atraen en fagocitosis o secretan enzimas hidrolíticas para digerir objetos extraños (Skubitz K, 1999). Por otro lado, los eosinófilos, son de suma importancia en la defensa contra infecciones de parásitos, participando como fagócitos, y citotóxicos en la presencia de anticuerpos y componentes del complemento (Moqbel y Becker, 1999). Asimismo, los basófilos circulan brevemente antes que migren dentro de las barreras de los tejidos, donde juegan un papel en las reacciones de hipersensibilidad inmediata, sus prominentes gránulos contienen un arsenal de mediadores de inflamación aguda, que incluyen histamina, serotonina, leucotrienos, activador de plasminógeno, entre otros (Befus y Denburg, 1999).

Macrófagos: Los macrófagos, son la forma madura de los monocitos, están distribuidos ampliamente en todo el cuerpo, donde juegan una parte crítica en la inmunidad innata. Los macrófagos internalizan sustancias por pinocitosis o fagocitosis, la vesícula internalizada se fusiona con los lisosomas y su contenido es procesado. En la respuesta inmune adaptativa, los macrófagos actúan como células presentadoras de antígeno, que promueven la viabilidad, proliferación y la secreción de citocinas, en linfocitos B y T. Además, secretan IL-1 que aumenta la proliferación de linfocitos (Valledor et al, 1998; Weinberg, 1999).

Células dendríticas (DC s): Las DC s tienen llamativas prolongaciones retorcidas o dendritas, que se extienden de su cuerpo. Las DC s están presentes en tejidos linfoides y no linfoides como la piel, pulmones y mucosa intestinal. Son móviles, eficientes presentadoras de antígeno, y proporcionan señales co-estimuladoras a células B y T. Las

DC s cambian su fenotipo dentro de su tiempo de vida, lo cual hace se dificulte la identificación de su fenotipo o determinar su ontogenia. La cuestión de que, si éstas derivan a partir del linaje monocito/macrófago todavía no está resuelta. Recientes trabajos apuntan que progenitores CD34+ para DC s, existen en la médula ósea y sangre periférica, y en cultivo *in vitro*, colonias de macrófagos y DC s son formadas de células tallo individuales, lo cual sugiere una temprana separación de los dos linajes. Sin embargo, un progenitor ha sido detectado en entre la población monocítica y linfocítica (Parakevas, 1999a, Ardavín, 2003).

Linfocitos: Existen dos tipos de linfocitos, los linfocitos B, que cuando son activados se diferencian a células plasmáticas secretoras de anticuerpos, y los linfocitos T, de los cuales existen dos clases. Las células T citotóxicas, que matan a células infectadas, y las células T cooperadoras, que activan a linfocitos y a macrófagos. Tanto las células B como las T tienen receptores altamente diversos en su superficie, que ayudan a reconocer al antígeno. Los receptores de un linfocito puede reconocer a un solo antígeno en particular, por lo tanto, cada linfocito reconoce un diferente antígeno, y conjuntamente los receptores de todos los linfocitos reconocen una amplia diversidad de antígenos (Paraskevas y Foerster, 1999).

Células NK: Las células asesinas naturales (NK: del inglés natural killer), fueron originalmente descritas de acuerdo a su capacidad para matar ciertas células tumorales de origen hematopoyético en ausencia de una estimulación previa. Subsecuentemente, fueron identificadas por anticuerpos monoclonales como una población discreta de linfocitos citolíticos, y son implicadas en varias actividades *in vivo*, tales como actividad contra células tumorales, resistencia a infecciones virales y regulación de la hematopoyesis. Las células NK son una de los principales componentes de la inmunidad innata, lisan selectivamente células viralmente infectadas, pero no a células no infectadas. Además, producen una variedad de citocinas como IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-3 e IL-8 (Janeway et al, 1999; Paraskevas 1999b).

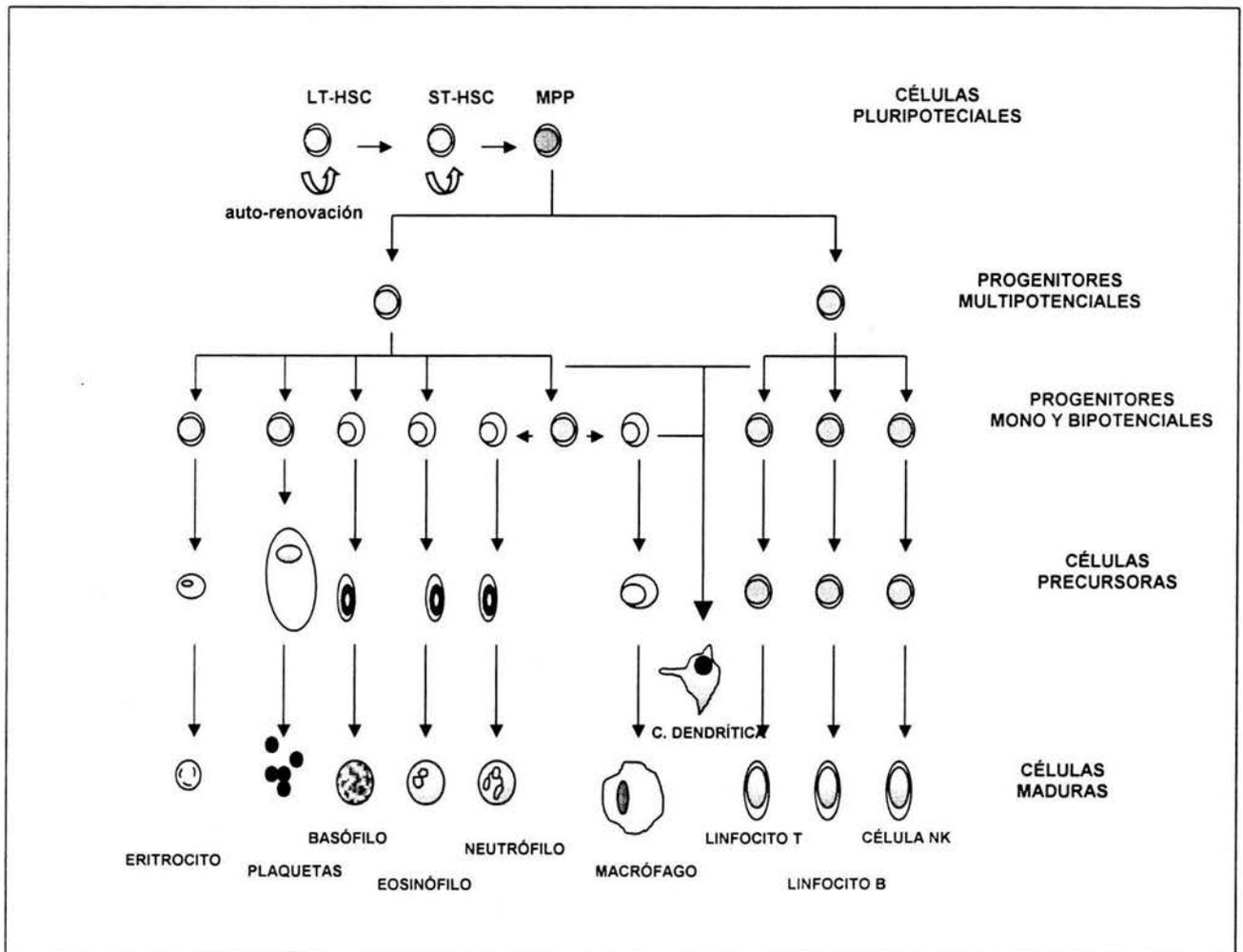


Figura 2. Modelo de la hematopoyesis. LT-HSC (célula tallo hematopoyética reconstituyente a largo plazo), ST-HSCs (célula tallo hematopoyética reconstituyente a corto plazo), MPP (progenitore pluripotencial). (Tomado y modificado de Weissman, 2000 y Kondo et al, 1997).

Regulación de la hematopoyesis

En condiciones normales, la mayoría de las CTH's se encuentran quiescentes (fase G_0 del ciclo celular), pero muchos de los progenitores más maduros están proliferando y produciendo progenie madura. Sin embargo, en situaciones como sangrado o infección ocurren varios eventos; los depósitos de células hematopoyéticas en la médula ósea o adheridas al endotelio son rápidamente liberadas a la circulación, y son localizadas en el sitio de daño, pocos progenitores y células maduras sufren apoptosis, además, las CTH's y progenitores son estimulados a proliferar y diferenciarse en leucocitos, eritrocitos y plaquetas. Cuando el sangrado, infección u otro tipo de stress cesa, y la demanda de células sanguíneas disminuye, los procesos anti-apoptóticos y proliferativos caen, las células sanguíneas son redistribuidas a sus sitios de almacenamiento, y la cinética de la hematopoyesis retorna a sus niveles basales. Este proceso se repite innumerables veces durante nuestras vidas, y se ha visto de forma exagerada después de quimioterapia o de trasplante de médula ósea (Smith, 2003; Schmidt et al, 2002).

El mantenimiento de la generación de células sanguíneas involucra una compleja interrelación entre los procesos genéticos intrínsecos de las células hematopoyéticas y su entorno. Esta interrelación determina si se mantienen quiescentes, proliferan, auto-renuevan, sufren diferenciación o apoptosis (Zandstra et al, 2000). En el adulto, estos procesos se llevan a cabo principalmente en la médula ósea, en un entorno específico denominado micro-ambiente hematopoyético. El micro-ambiente hematopoyético, está compuesto de un componente celular y un componente proteico, que en conjunto regulan la hematopoyesis (Whetton y Spooncer, 1998) (figura 3).

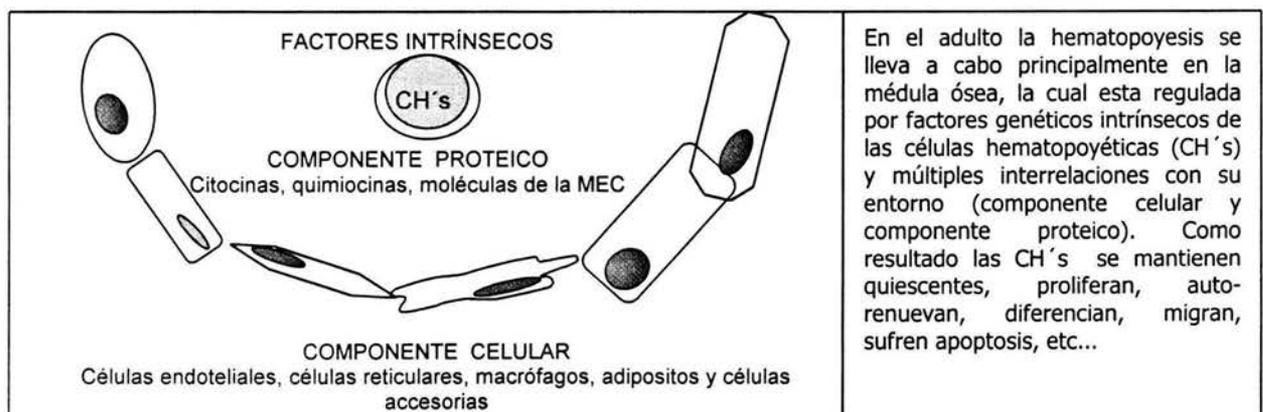


Figura 3. Regulación de la hematopoyesis en el micro-ambiente hematopoyético de la médula ósea. (Tomado de Whetton y Spooncer, 1998)

Componente celular

El componente celular de la médula ósea incluye células propiamente estromales, como endoteliales, reticulares, adipositos y osteoblastos, que están de manera permanente. Así como monocitos, linfocitos y células NK, denominadas células accesorias por estar de forma transitoria. Las células estromales secretan y expresan una gran cantidad de moléculas de la matriz extracelular (MEC) como colágeno I-VI, fibronectina, tenascina y laminina, y moléculas de adhesión celular (CAM s). Además, junto con las células accesorias, producen un gran número de citocinas y quimiocinas, las cuales se encuentran en solución y/o unidas a las células o a la matriz extracelular (tabla 1) (Prosper y Verfallie, 2001; Temeles et al, 1993). Asimismo, las células tallo y progenitoras hematopoyéticas expresan receptores, que facilitan las interacciones específicas ligando-receptor, célula-célula y célula-MEC, afectando los movimientos (retención, entrada a la circulación, homing y migración / retención), la proliferación, la diferenciación y el destino celular (Blanco et al, 2001; Yamada et al, 2000; Batard et al, 2000).

TABLA 1. Regulación de la hematopoyesis: Componente celular de la médula ósea.

Revisado en Lemischka, 1997 y en Whetton y Spooner, 1998)

CÉLULAS	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
ENDOTELIALES	Constituyen los vasos sanguíneos. Se encuentran asociadas con fibroblastos, adipositos, megacariocitos, células plasmáticas y células hematopoyéticas (C.H's).	Interacciones directas célula-célula, controlan la entrada a la circulación de CH s. Secretan CSF s, IL-6, colágena tipo II y laminina.
RETICULARES Adventicias Fibroblásticas	Son el componente más abundante de la médula ósea. Adventicias: En sinusoides venosos Fibroblásticas: Dentro de la médula ósea en contacto con células granulocíticas inmaduras.	Adventicias: Migración de C.H's. Fibroblásticas: Secreción de CSF s, SCF, IL-1 e IL-6. Colágena tipo I y II y fibronéctina.
MACRÓFAGOS	Se encuentran en diferentes sitios: Asociados a islas de eritroblastos, al endotelio y dispersos entre las CH's.	Interacciones célula-célula. Secretan: CSF's, IL-1, 3, 6 y 8, TNF- α , MIP e IL-1.
ADIPOSITOS	Ocupan el mayor espacio de la médula ósea.	Su función no es muy clara, posiblemente secreten factores inhibidores, pues aparecen en cultivos a largo plazo cuando la hematopoyesis decae (médula amarilla).
OSTEOBLASTOS	Dentro del hueso.	Secreta la matriz del hueso y además CSF s, IL-1 y 6, TGF- β y TNF- α .
ACCESORIAS (Células NK Monocitos Linfocitos)	Presentes de manera transitoria.	Secretan CSF s IL-1, 2, 3, 4 y 10 y TNF- α .

Componente proteico

Citocinas

Del componente proteico, las citocinas son los reguladores hematopoyéticos mejor caracterizados. Las citocinas, son glicoproteínas que actúan por unión a receptores específicos, y activan una variedad de trayectorias de señalización (Molineux y Mazanet, 2000). En general, los receptores para citocinas tienen un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. Basados en las características estructurales y funcionales de sus receptores, han sido reconocidas varias familias de citocinas. La familia de receptores con actividad tirosina cinasa (RTK s), la familia de receptores de citocinas (RC s), la familia del factor de crecimiento transformante (TGF) y la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Heldin, 2001) (tabla 2).

CARACTERÍSTICAS	ACTIVIDAD	MECANISMO DE ACCIÓN
*Todas son proteínas *Su expresión es regulada (traducción y/o transcripción) *Su producción es transitoria *Su radio de acción es corto (excepto eritropoyetina) *Sus acciones son pleiotrópicas (su efecto depende del tipo celular y del estadio de diferenciación) *Actúan uniéndose a receptores de membrana *Alteran la expresión génica de sus células blanco *Pueden tener acciones sinérgicas o antagónicas	Ejercen su efecto sobre la *Proliferación *Auto-renovación *Viabilidad *Diferenciación *Sensibilización *Migración *Homing *Apoptosis	Unión a receptores de membrana A) Con actividad tirosina cinasa (RTK s) B) Sin actividad tirosina cinasa intrínseca (Receptores de citocina) C) De la familia de TGF d) De la familia de TNF

En los RTK's, la unión del ligando induce homo o heterodimerización de los receptores, seguida de autofosforilación en residuos de tirosina. La fosforilación en tirosina tiene un papel regulatorio de la actividad tirosina cinasa, y además, crea sitios de unión para proteínas adicionales que transmiten la señal. Las proteínas adicionales tienen un dominio de unión específico para fosfotirosina, el mejor caracterizado de estos dominios es el llamado SH2 (homólogo a Scr-2) (Socolovsky et al, 1998; Fantl, 1992).

Por otro lado, los RC's no tienen actividad tirosina cinasa intrínseca, pero están asociados con proteínas de la familia de Janus cinasa (JAK). La unión de la citocina induce agregación del receptor, juxtaposición de las proteínas JAK s, y su activación por fosforilación cruzada. Las JAK s una vez activadas, fosforilan múltiples residuos de tirosina del dominio citoplasmático del receptor, y al igual que los RTK s crean sitios de reclutamiento para proteínas con dominios SH-2 (Piazza F et al, 2000; Alberts et al, 1994).

En conjunto, la activación de RTK s y RC s inician múltiples cascadas que involucran a Ras, fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), fosfolipasa C- γ y los transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT s). Estas trayectorias, culminan en la regulación de la expresión génica en el núcleo (Brivanlou y Darnell, 2002; Krebs y Hilton, 2001; Barreda et al, 2004) (figura 4A y B).

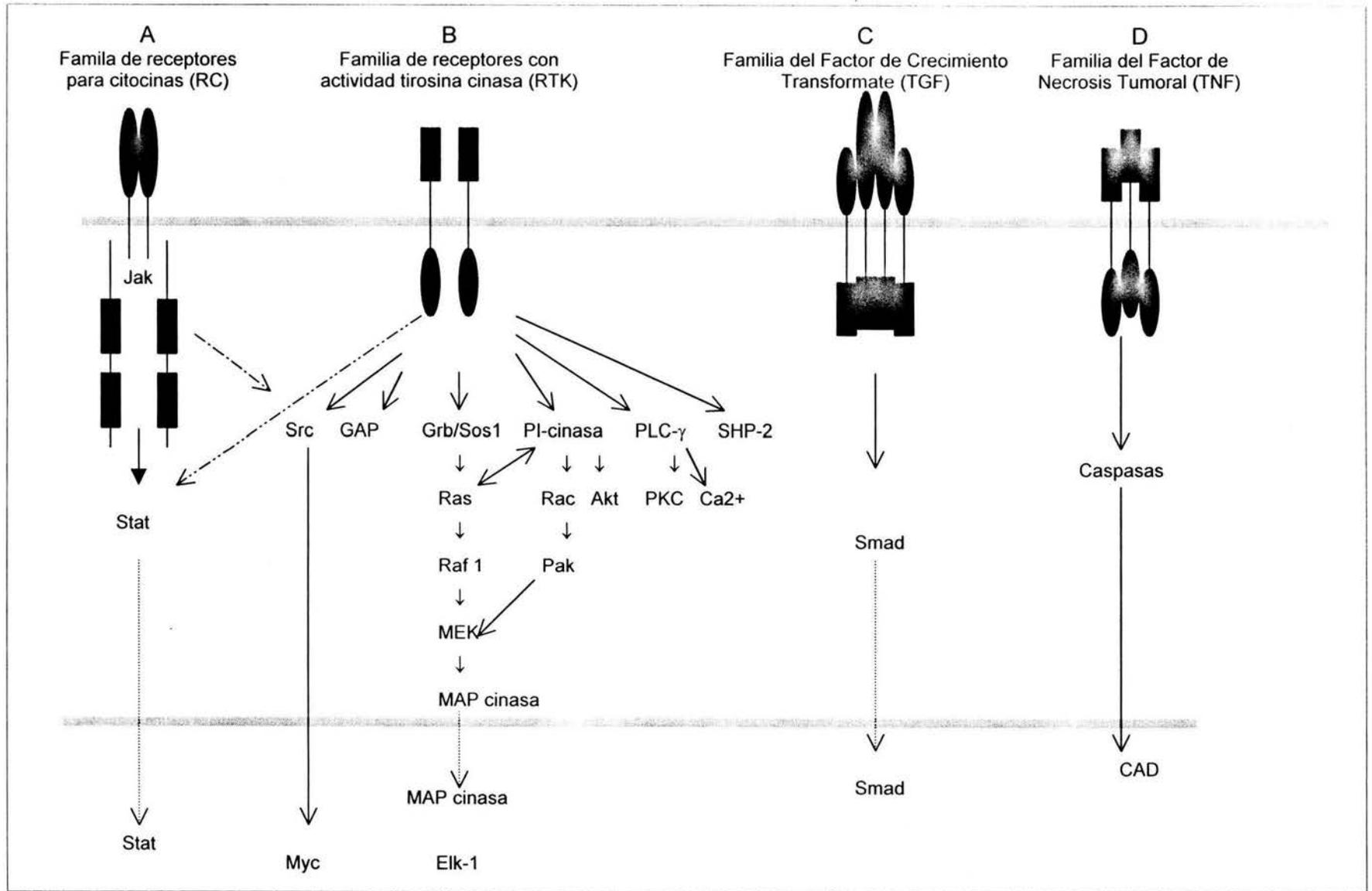
Por otro lado, en los miembros de la familia de TGF- β , la unión del ligando induce la formación de un complejo heterotetrámero con actividad serina/treonina cinasa. Los receptores así activados fosforilan miembros de la familia de factores de transcripción llamados SMAD s, que se translocan al núcleo, y estimulan la transcripción de genes (Lewin, 2001; Massagué, 1998) (figura 4C).

Por su parte, los miembros de la familia de TNF unen y trimerizan receptores desprovistos de actividad cinasa. Muchos de estos receptores tienen dominios conservados en su parte intracelular designados como dominios de muerte, estos dominios median el contacto con moléculas adaptadoras que unen a componentes de la cascada proteolítica que conduce a la apoptosis (Nagata, 1999; Locksley, 2001) (figura 4D).

En general, las citocinas influyen en las actividades de las células hematopoyéticas de todos los compartimentos. Algunas citocinas tienen un efecto relativamente específico sobre un linaje, mientras que otras tienen un amplio espectro de acción. Por ejemplo, la administración *in vivo* de G-CSF, Epo o Tpo, tiene efectos relativamente específicos en las

producción de granulocitos, eritrocitos o plaquetas, respectivamente (Socolovsky et al, 1998). Contrariamente, GM-CSF, IL-3 y SCF; actúan sobre progenitores de varios linajes, incluyendo células primitivas (Barreda et al, 2004; Broudy, 1997). Asimismo, la combinación de dos o más factores pueden tener un efecto sinérgico, tanto en el reclutamiento de precursores adicionales o en el aumento en el potencial de proliferación de células en división. Por ejemplo, SCF en combinación con un número de citocinas que incluyen Epo, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3 o IL-6; amplifica fuertemente el número de células presentes en las colonias de linaje específicas para estas citocinas (Metcalf, 1991). Finalmente, aunque los progenitores comprometidos parecen responder eficientemente a factores de crecimiento de linaje específico, los progenitores más primitivos requieren la combinación de estímulos (Broudy, 1997).

FIGURA 4. CITOCINAS: Receptores, transducción de señales y activación transcripcional. (Tomado de Heldin, 2001).



Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de proteínas de entre 8 y 12 kDa, que fueron primeramente nombradas por su capacidad de actuar como citocinas quimiotácticas de células sanguíneas maduras. Sin embargo, han sido implicadas en otros procesos biológicos como la hematopoyesis, la angiogenesis y la metástasis (Baggiolini, 1998; Rollins, 1997).

Actualmente, se conocen más de 50 quimiocinas, clasificadas en cuatro subgrupos, distinguidos por la posición del aminoácido cisteína (C) en la porción amino terminal de la molécula. El principal subgrupo de las quimiocinas es nombrado CXC, debido a que las dos cisteínas están separadas por un solo aminoácido, contrario al subgrupo (CC) donde las cisteínas son adyacentes. Además, ha sido identificada una quimiocina para un subgrupo C y otra para un subgrupo CX₃C (Rollins, 1997). Las quimiocinas, unen a receptores transmembranales acoplados a proteínas G. Se han identificado, diez receptores para quimiocinas CC designados CCR1 a CCR10, cinco receptores para quimiocinas CXC designados CXCR1 a CXCR5, un receptor para la quimiocina C (XCR1), y un receptor para la quimiocina CX₃C (CX₃CR1) (Power, 2003; Nelson y Krensky, 2001).

Los estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que el sistema de quimiocinas es altamente redundante. Puesto que la mayoría de las quimiocinas unen a más de un receptor, y la mayoría de receptores unen a múltiples quimiocinas. Además, varias quimiocinas también son redundantes en sus acciones (Power, 2003).

En la hematopoyesis, las quimiocinas modulan el homing y el tráfico de células tallo y progenitoras, además, pueden afectar de manera negativa o positiva su proliferación. Por ejemplo, la quimiocina SDF-1, es esencial para el tráfico de células hematopoyéticas en el desarrollo embrionario, mediar el homing de las CTH s y progenitores a la médula ósea después de transplante (Smith, 2003). La inhibición de la hematopoyesis por quimiocinas, se ha reportado principalmente en progenitores mieloides estimulados a proliferar *in vitro*, al adicionarse la quimiocina en combinación con factores de crecimiento, como eritropoyetina, IL-3, GM-CSF y SCF. Algunas quimiocinas de los subgrupos CXC y CC, pueden suprimir, estimular o no presentar efectos en la hematopoyesis. Mientras, que la limfotactina (único miembro del subgrupo C) presenta un efecto supresor y la fractalkina/neuractina (único miembro de CX₃C) no presenta actividad supresora (Broxmeyer y Kim, 1999).

Componentes de la matriz extracelular

Las moléculas de la matriz extracelular (MEC) son otros importantes reguladores de la hematopoyesis. Las células tallo y progenitores, unen estrechamente a heparan sulfato, colágeno, laminina, trombospodina-1, fibronectina y otras moléculas de la MEC. Estas moléculas, proveen un soporte (andamio) para la co-localización de progenitores, CTH s, y un amplio número de reguladores de crecimiento. Además, las moléculas de la MEC y los componentes estromales pueden directamente activar el crecimiento, proteger de apoptosis, o modular repuestas de reguladores positivos o negativos, en progenitores y CTH s (Verfallie et al, 1994; Papayannopoulou y Craddock, 1997).

Las moléculas de adhesión en la superficie de CTH s y progenitores, que median la unión a los componentes de MEC incluyen integrinas, selectinas y mucinas (Simmons et al, 1997). La interacción de las células con estos elementos dispara una variedad de trayectorias de señalización, y pueden llevar a cambios en iones intracelulares como protones, calcio, así como la GTPasa pequeña Rho y mediadores lipídicos tales como metabolitos de diacilglicerol, fosfatidil inisitol y ácido araquidónico. La adhesión puede también regular la expresión de genes de repuesta temprana, como *c-fos* y eventos clave del ciclo celular, como la actividad cinasa de los complejos de ciclina y fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb). Además, la adhesión celular puede potenciar la respuesta a factores de crecimiento, mediante la modulación de los componentes río abajo de la señalización, como PI 3 cinasa, AKT y p70rsk (Whetton y Spooncer, 1998; Smith, 2003).

Alteraciones en la regulación de la hematopoyesis

La interacción ligando-receptor resulta en la activación de trayectorias de señales bioquímicas. Estas trayectorias culminan en la activación de factores de transcripción y la consecuente expresión de los productos proteicos de genes específicos, que mantienen la sobrevivencia, disparan la proliferación o promueven la diferenciación hacia células sanguíneas maduras. Sin embargo, la regulación de la hematopoyesis puede presentar alteraciones en las diferentes fases, que resulten en modificaciones cuantitativas y funcionales en las poblaciones de células hematopoyéticas.

Alteraciones como mutaciones, translocaciones o la inversión de genes, de los cuales sus productos regulan la proliferación, diferenciación o la sobrevivencia celular, resulta en la generación de moléculas de señalización anormales o un incremento en la expresión de proteínas reguladoras. Estos genes anormales son referidos como oncogenes, y sus contrapartes normales son referidos como proto-oncogenes. Los oncogenes contribuyen a la transformación maligna promoviendo una proliferación descontrolada, bloqueo en la diferenciación normal o la prevención de la apoptosis. En contraste a los oncogenes, los genes supresores de tumor (o anti-oncogenes) codifican a proteínas que regulan negativamente la proliferación. La inactivación funcional de ambas copias de un gene supresor de tumor por pérdida o mutación, es comúnmente requerida para promover la transformación maligna. Entonces, los genes supresores de tumor son genéticamente recesivos en la transformación, mientras que los oncogenes son dominantes (Sawyers, 1999; Wickremasinghe y Hoffbrand, 2000; Ortega et al, 2002).

Las alteraciones en células hematopoyéticas progenitoras llevan a enfermedades hematológicas como las leucemias. Las leucemias se caracterizan por un incremento excesivo en el número de células hematopoyéticas presentes tanto en médula ósea como en sangre periférica, como resultado de una proliferación desregulada y sin sentido de clones derivados de la transformación de células seminales o progenitoras. Las células leucémicas no son capaces de diferenciarse completamente o de funcionar adecuadamente, debido a que los mecanismos que controlan la proliferación y/o diferenciación se ven afectados, lo cual les confiere ventajas de crecimiento sobre las células que participan en la hematopoyesis normal (Jandl, 1991; Cousar, 1999).

2.2. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LAS CASEÍNAS

Propiedades generales

La leche y los productos lácteos son componentes importantes en la dieta humana. A nivel mundial, contribuyen con cerca del 4% de la energía total, y en algunas zonas geográficas como Norte América, Australia y Europa su contribución es hasta del 10% (FAO 1995-1999). Aunque existe una considerable variación geográfica con la de otras especies, la leche de vaca es la más frecuentemente consumida (Kon, 1977). 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 (tabla 3). De la fracción proteica, compuesta por α -lactalbúmina, β -lactoglobulina y caseína, esta última es el principal componente (80%). La caseína se encuentra en forma de micelas, conformada por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas α -s₁, α -s₂, β - y κ -caseína (tabla 3), además la caseína puede ser diluida en un álcali para producir caseinatos (Walstra y Jenneis, 1984).

Actividades Biológicas

Las proteínas de la leche, además de tener una importante función nutricional proporcionando aminoácidos (Koletzko et al, 1998), diversos estudios les atribuyen funciones fisiológicas más específicas. Recientemente, se encontró que la α -lactalbúmina, además de ser la subunidad B de la lactosa sintetasa -la enzima que cataliza la adición de galactosa a la glucosa para producir lactosa- (Brodbeck et al, 1966), puede inducir apoptosis en células tumorales (Permyakov y Berliner, 2000). Aunque la función biológica de la β -lactoglobulina no ha sido claramente resuelta, la β -lactoglobulina une ácidos grasos y retinol *in vitro*, además puede aumentar la toma de retinol en el intestino, por lo que se sugiere, esté involucrada el transporte de retinol y en el metabolismo de los ácidos grasos en el recién nacido (Perez y Calvo, 1995; Futterman et al, 1972). Con respecto a la caseína, los estudios revelan que tienen una variedad de actividades, la mayoría sobre células hematopoyéticas maduras.

Desde hace ya varias décadas se conoce que en ratones, la privación de proteínas en su dieta daña la hematopoyesis, y ésta es restaurada al ser alimentados con una dieta rica en proteínas como la caseína (Aschkenasy, 1968, Aschkenasy, 1971). Estudios similares a los de Aschkenasy fueron realizados durante la década pasada por Okano M,

quien observó que en los ratones alimentados con caseína, la restauración de la eritropoyesis es provocado por un aumento en las concentraciones de eritropoyetina (Okano et al, 1992), sin embargo, también reporta que el incremento en los niveles de eritropoyetina, no está asociada sólo al incremento en los niveles de aminoácidos proporcionados por la caseína, y entre sus propuesta señala que alguna proteína parcialmente digerida o un aminoácido específico pueda ser responsable de la restauración de la eritropoyesis (Okano, 1992).

Asimismo, la caseína y su sal el caseinato de sodio (CasNa) al ser inyectados intraperitonealmente en ratones, favorecen la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos (Lotem y Sachs, 1985; Pasotti et al, 1993; Metcalf et al, 1996), además del efecto quimiotáctico, existe actividad estimuladora de colonias para granulocitos y para macrófagos, en el suero y en el exudado de la cavidad peritoneal de los ratones inyectados (Lotem y Sachs, 1985). Los ratones también adquieren resistencia a la infección bacteriana, misma que es explicada por la reacción inflamatoria y el incremento de G-CSF (Noursadeghi et al, 2002; Metcalf et al, 1996)

La actividad en células hematopoyéticas de las caseínas y el CasNa ha sido también evaluada *in vitro*. La β -caseína aumenta la producción del anión superóxido por neutrófilos y la respuesta proliferativa de linfocitos (Wong et al, 1996). La α -caseína hidrolizada por *Lactobacillus rhamnosus* (una bacteria que promueve la degradación de proteínas en el intestino) disminuye la producción de IL-2 en linfocitos T activados (Pessi et al, 2001). Además, resultados del laboratorio señalan, que células en banda de médula ósea aceleran su diferenciación a neutrófilos segmentados en presencia de CasNa (Bautista, 1998). Las actividades mencionadas de las caseínas o sus derivados, pueden ser explicadas por la presencia de algún tipo de receptor en las células hematopoyéticas, puesto que, empleando caseína fluorescente y la técnica de citometría de flujo proponen la existencia de receptores específicos para caseína en neutrófilos y monocitos (Lewis y Van Epps, 1983). Finalmente, hay indicios de actividad antitumoral *in vivo* de la caseína, ratas alimentadas con una dieta rica en caseína tienen una notable disminución de la carcinógenesis de colón inducida con azoximetano, al compararlas con ratas con una dieta baja en caseína (Tatsuta et al, 1992).

FRACCIÓN PROTEÍCA (3.6%)	CASEÍNAS	80
	ALFA S1	34
	ALFA S2	8
	BETA	25
	KAPPA	9
	LAMBDA	4
	PROTEÍNAS DEL SUERO	20
	ALFA-LACTALBÚMINA	4
	BETA-LACTOGLOBULINA	9
	INMUNOGLOBULINAS	1
	PROTEASAS-PEPTONAS	2
GRASAS (4.1%)	TRIGLICÉRIDOS	95-96
	DIGLICÉRIDOS	1.26-1.59
	MONOGLICÉRIDOS	0.016-0.038
	GLICÉRIDOS CETO-ACIDOS	0.85-1.28
	GLICÉRIDOS HIDROXI-ACIDOS	0.60-0.78
	ACIDOS GRASOS LIBRES	0.10-0.44
	FOSFOLÍPIDOS	0.80-1.00
	ESFINGOLÍPIDOS	0.06
	ESTEROLES	0.22-0.41
	COLESTEROL	0.419
	ESCUALENO	0.007
	CAROTENOIDES	<0.001
VITAMINAS (<1%)		mg/100 mL
	LIPOSOLUBLES	
	A	0.08
	B	0.00006
	E	0.1
	K	0.0005
	HODROSOLUBLES	
	B1 (TIAMINA)	0.05
	B2 (RIBOFLAVINA)	0.17
	B6 (PIRODOXINA)	0.06
	B12 (CIANOCOBALAMINA)	0.00045
	BIOTINA	0.003
	NIACINA	0.1
	AC. PANTOTÉNICO	0.35
	AC. FÓLICO	0.006
C	2.1	
MINERALES (<1%)		mg/100 mL
	CALCIO	130
	POTASIO	140
	MAGNESIO	60
	COLORO	12
	FÓSFORO	119
AZUFRE	30	
CARBOHIDRATOS		(5%)
AGUA		(86.6%)

Tabla 3. Composición de la leche bovina.

2.3. PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE LAS CASEÍNAS

En la estructura primaria de varias proteínas, han sido identificados una gran cantidad de péptidos bioactivos. Los péptidos, inactivos dentro de la secuencia de la proteína madre, pueden ser liberados por proteólisis enzimática y tener actividades tanto *in vivo* como *in vitro* (Jinsmaa y Yoshikawa, 1999). En particular, los péptidos derivados de las caseínas tienen propiedades antihipertensivas, antitrombóticas, inmunomoduladoras, antimicrobiales, antitumorales y agonistas o antagonistas opioide (Meisel y Bockelmann, 1999) (tabla 4).

Actividades Generales

La actividad antihipertensiva de péptidos originados de la α - y β -caseína se ha reportado *in vivo* e *in vitro*, y se propone esté relacionada con la inhibición competitiva de la enzima convertidora de angiotensina 1 (ACE 1), la cual cataliza tanto la producción del vasoconstrictor angiotensina II y la inactivación del vasodilatador bradikinina (revisado en Yamamoto, 1997, Meisel y Schlimme, 1994).

Los péptidos antitrombóticos derivados de la κ -caseína llamados casoplateínas, son inhibidores de la agregación de plaquetas, se ha propuesto que esta acción es por su analogía estructural con la cadena γ del fibrinógeno y entrar en competencia con los receptores en las plaquetas, inhibiendo de esta forma su agregación (Jolles et al, 1986).

Un fragmento 165-203 (f165-203) de la α -caseína tiene propiedades antibacteriales y es conocido como casocidina-1. La casocidina-1 inhibe el crecimiento de *E coli* y *S carnosus*, su actividad parece estar correlacionada su carga neta positiva (Zucht et al, 1995), puesto que péptidos catiónicos matan a los microorganismos sensibles incrementando la permeabilidad de la membrana (Meisel, 1997).

Por otro lado, el papel antitumoral del f90-95 (90-95 α -casomorfina) de la α -caseína, del f60-64 (1-5 β -casomorfina) y del f60-66 (1-7 β -casomorfina) de la β -caseína ha sido mostrada *in vitro* al disminuir la proliferación de líneas celulares de cáncer de seno (T47D, LNCaP) y próstata (DU145 y PC3). En la acción antitumoral los receptores opioides juegan un papel fundamental (Kampa et al, 1996, Hatzoglou et al, 1996).

La característica estructural común entre los ligandos opioides endógenos (endorfinas) y varios péptidos derivados de las caseínas, es la presencia de un residuo de tirosina en el amino terminal (excepto péptidos de α -caseína) y la presencia de otro residuo aromático (fenilalanina o tirosina) en la tercera o cuarta posición. Se piensa que al igual que en las endorfinas, este dominio sea importante en la unión de los péptidos al receptor opioide. Además de su semejanza estructural, la actividad de los péptidos queda anulada por antagonistas específicos de receptores opiáceos como naloxone, por lo es aceptado que éstos péptidos actúan vía receptores opioides (Hatzoglou et al, 2000; Blass y Blom, 1996). Así, estos péptidos exógenos con actividad parecida a endorfinas provenientes principalmente de la β - y α -caseína, se les llama comúnmente casomorfina. Sin embargo, la actividad no solo es agonista, algunos reportes indican una acción de tipo antagonista opioide de péptidos derivados de κ -caseína (caxosinas) y α -caseína (Meisel, 1997; Chiba, 1989).

Actividad en leucocitos

La actividad de los péptidos generados de las caseínas ha sido demostrada en células hematopoyéticas maduras. Un péptido derivado de la α -caseína (f194-199) y dos de la β -caseína (f63-68, f191-193) estimulan la fagocitosis de eritrocitos de carnero por macrófagos murinos (Migliore-Samour y Jolles, 1988; Parker et al, 1984) y ejercen un efecto protector contra la infección de *Klebsiella pneumoniae* (Berthou et al, 1987), además, el f193-209 incrementa la presencia del complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 y la actividad fagocítica de macrófagos (Sandré et al, 2001). Asimismo, la estimulación de la proliferación de linfocitos de sangre periférica (LSP) es incrementada o disminuida por la 1-7 β -casomorfina y el f192-202 (β -casokinina10) de la β -caseína (Elitsur et al, 1991; Kayser y Meisel, 1996). En lo que respecta a neutrófilos, éstos se ven afectados por los péptidos en algunas de sus funciones básicas, como la producción de radicales libres de oxígeno y del anión superóxido (Rabgaoui et al, 1994).

Los mecanismos por los cuales los péptidos ejercen su actividad en células hematopoyéticas no está bien definido, sin embargo, los resultados obtenidos con los linfocitos sugieren que los péptidos pueden actuar vía receptores opioides, sumado a esto, son conocidas las relaciones entre el sistema inmune y péptidos opioides, puesto que

receptores opioides están presentes en linfocitos, macrófagos y neutrófilos (McCarthy et al, 2001), y además, estas células producen ligandos opioides endógenos (Rittner et al, 2001).

Secuencia peptídica	Fragmento	Nombre	Función biológica	Mecanismo de acción
α-caseína				
RYLGYLE	90-96	90-96 α -casomorfina	Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides
RYLGYL	90-95	90-95 α -casomorfina	Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides
FFVAP	23-27	α s1-casokinina-5	Antihipertensivo	Inhibidor de angiotensina
FPEVFGK	28-34	α s1-casokinina-7	Antihipertensivo	Inhibidor de angiotensina
TTMPLW	194-199	α s1-casokinina-6	Antihipertensivo	Inhibidor de angiotensina
YVPXP	158-162	α s1-casomorfina	Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides
β-caseína				
YPPFGPI	60-66	1-7 β -casomorfina	Proliferación de linfocitos Hipoalgesia en ratas Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides
YPPFG	60-64	1-5 β -casomorfina	Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides
LLY	191-193	Inmunopéptido	Activación de macrófagos	No se ha determinado
AVPYPQR	177-183	β -casokinina-7	Antihipertensivo	Inhibidor de angiotensina
YQQPVLGPVR	193-202	β -casokinina-10	Proliferación de linfocitos	No se ha determinado
YQQPVLGPVRG PFPIIV	193-209	No se ha determinado	Incrementa la activación microbicida de macrófagos	No se ha determinado
κ-caseína				
SRYPY	33-38	Casoxina-6	Antagonista opioide	Receptores opioides
YIPIQYVLSR	25-34	Casoxina-C	Antagonista opioide	Receptores opioides
MAIPPKNQDK	106-116	Casoplateína	Actividad antitrombótica	Analogía estructural con el fibrinógeno

Tabla 4. Funciones biológicas de algunos péptidos derivados de α -, β - y κ -caseína. (Tomado y modificado de Meisel, 1997)

Presencia fisiológica

Durante la digestión de las caseínas enzimas proteolíticas liberan péptidos, y luego otras peptidasas degradan estos péptidos en aminoácidos que son absorbidos por la mucosa intestinal. No obstante, hay indicios de que algunos péptidos son resistentes a los procesos de hidrólisis y pueden ser absorbidos. Por ejemplo, la 1-7 β -casomorfina fue detectada en el intestino delgado después de la ingestión de leche en humanos adultos (Svedberg et al, 1985), y un precursor estable de este mismo péptido (Val-1-7 β -casomorfina) fue localizado en el intestino delgado y en la sangre de corderos después de haberse suministrado de forma oral (Read et al, 1990), 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 α -s₁, y otro de la κ -caseína) con actividad biológica potencial pasaron a la sangre (Chabance et al, 1998); además estudios *in vitro* han revelado que enzimas gastrointestinales tienen la capacidad de generar varios péptidos de la β -caseína con actividad opioide (Jinsmaa y Yoshikawa, 1999). Por lo tanto, se propone que algunos fragmentos de las caseínas sean parcialmente resistentes, y absorbidos en cantidades fisiológicamente activas, ejerciendo un efecto a nivel local en el tubo digestivo o bien a distancia una vez que han ingresado en el sistema circulatorio (Meisel, 1997; Teschemacher, 1997). A pesar de que los mecanismos de su absorción son poco conocidos y representan una fase clave en la comprensión de su papel fisiológico, los péptidos funcionales son pequeños, en general contienen entre 3 y 10 aminoácidos y sumado al hecho de que son hidrofóbicos puede explicar su absorción (figura 5).

De forma análoga a lo que sucede durante la digestión, en los productos comerciales derivados de la leche (quesos, yogurts, cremas, etc.), se han encontrado péptidos bioactivos, generados por enzimas de bacterias lácticas (Muehlenkamp y Warthesen, 1996). En México el grupo del Dr. Hernández Sánchez del Instituto Politécnico Nacional se ha dedicado a analizar diversos productos lácteos para identificar péptidos de las caseínas que ya se conoce tienen actividad biológica (Hernández et al, 1999). Así, cuando consumimos productos lácteos fermentados los péptidos bioactivos pueden formarse durante el proceso de fermentación y/o durante la digestión (figura 5).

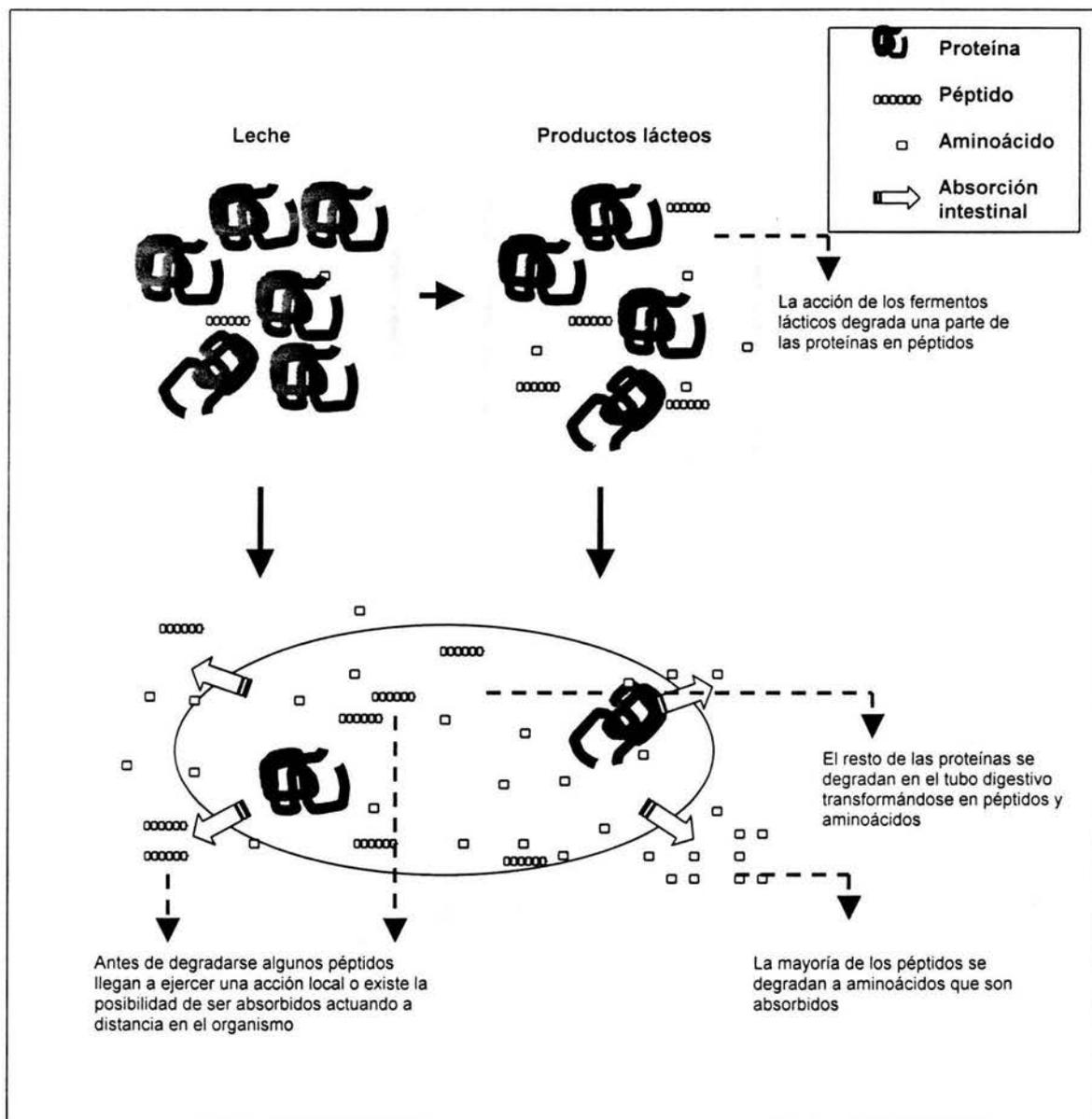


Figura 5. Formación y acción péptidos biológicamente activos. Durante la fermentación de los productos lácteos y durante la digestión de las proteínas, enzimas proteolíticas liberan péptidos biológicamente activos, éstos pueden ser absorbidos y pasan al torrente sanguíneo y así presentar actividades semejantes a hormonas.

2.4. CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS Y PÉPTIDOS OPIOIDES

Los péptidos opioides son una familia de neuromoduladores endógenos. Los primeros miembros de esta familia caracterizados fueron la Met- y Leu-encefalina, aisladas del cerebro donde es más abundante. Actualmente, más de 20 péptidos han sido identificados del cerebro, hipófisis y glándulas suprarrenales. Estos péptidos tienen una secuencia amino terminal común (NH₂-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu) y derivan del rompimiento de grandes proteínas precursoras traducidas por tres diferentes genes, llamadas prepro-opiomelanocortina, preproencefalina y prodinorfina. Su distribución anatómica a sido ampliamente estudiada y sus funciones fisiológicas están relacionadas (Danielson y Dores, 1999).

Los péptidos opioides están involucrados en numerosos procesos fisiológicos que incluyen el control del dolor, respuesta al estrés, locomoción, conocimiento, y generalmente actúan a lo largo de vías neurales. Este grupo de péptidos también modulan la fisiología neuroendócrina, y controlan funciones autónomas como la respiración, presión sanguínea, termorregulación y motilidad gastrointestinal (Ping-Yee y Horace, 1999).

Los efectos biológicos de los péptidos opioides, es a través de tres clases de receptores de membrana designados μ , δ y κ . Los receptores opioides son también blanco de moléculas no peptídicas exógenas como la morfina, provocando fuertes acciones psicotrópicas y analgésicas (Gavériaux et al, 1995; Loh y Smith, 1990). Las drogas opioides producen sus efectos analgésicos y acciones adictivas mimetizando a los péptidos endógenos, y esto conduce a una sobre-activación de los receptores interfiriendo con el fino control del sistema fisiológico siendo responsable de sus efectos colaterales (Kieffer, 1995).

Las evidencias del papel de péptidos opioides en la modulación del sistema hematopoyético se han incrementado en los últimos años, los reportes describen efectos supresivos o estimuladores en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (Boranic et al, 1997; Makman M et al, 1995). Paralelo a esto se ha demostrado la existencia de receptores opioides en células hematopoyéticas maduras, inicialmente se observaron por la unión de ligandos sintéticos específicos, detectándose el receptor δ en linfocitos y leucocitos de sangre periférica (Carr et al, 1988; Sharp et al, 2001) y el receptor κ en la línea monocítica P-388 (Carr et al, 1991). La reciente clonación del receptor opioide δ en una línea celular de neuroblastoma de ratón y la identificación de los homólogos δ y κ del cerebro de

roedores, han otorgado herramientas moleculares (RT-PCR) para probar la existencia de los receptores opioides en el sistema hematopoyético, y se ha concluido que a pesar de que no están distribuidas ampliamente, el receptor μ se encuentra en monocitos y linfocitos de sangre periférica, mientras que el receptor δ se expresa en algunas líneas de células T (MOLT-4, CEM, HSB2) y de monocitos (U937) (Gavériaux et al, 1995).

Los receptores opioides presentes en las células hematopoyéticas son funcionales, existen múltiples reportes de los efectos de ligandos opioides sobre células maduras y en líneas celulares (Roy et al, 1996; Kavelaars et al, 1991; Chiappelli et al, 1992). Con respecto a células hematopoyéticas progenitoras, se ha observado un aumento en el número y tamaño de colonias en cultivos de médula ósea en presencia de M-CSF y GM-CSF en combinación con β -endorfina (Hagi et al 1995), o Met-enkefalina (Krizanac-Bengez et al, 1995), efecto bloqueado por el antagonista opioide naloxone. Estos datos han sugerido que los ligandos y receptores opioides tienen una fuerte participación en la hematopoyesis (McCarthy et al, 2001; Rittner et al, 2001; Golub et al, 1988).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hematopoyesis involucra la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas (Metcalf, 1999), eventos regulados principalmente por interleucinas y factores de crecimiento hematopoyético (Barreda et al, 2004), sin embargo, estos eventos también pueden ser afectados por otros factores o factores exógenos. De particular interés son las caseínas y algunos péptidos obtenidos de su secuencia primaria, que además de tener un importante valor nutricional, sus actividades biológicas incluyen a células hematopoyéticas maduras. Pero, aunque se ha determinado que el CasNa, las caseínas y algunas casomorfina incrementan o disminuyen la actividad de neutrófilos, macrófagos y linfocitos (Pessi et al, 2001; Meisel et al, 1997; Wong et al, 1996), no se conoce su papel en la hematopoyesis. Recientemente en el laboratorio, se determinó que el CasNa acelera la maduración de células en banda a neutrófilos segmentados y estimula la secreción de M-CSF (Bautista, 1998), una citocina implicada en la generación y función de macrófagos. Estos antecedentes nos indicaron que no sólo células hematopoyéticas maduras pueden responder al CasNa y a las caseínas, por lo que, se abre la posibilidad de que células más primitivas involucradas directamente en la hematopoyesis también sean blanco de estas moléculas.

Con el propósito de determinar el papel de el CasNa, las caseína y casomorfina en la hematopoyesis, en el presente trabajo estudiamos sus efectos en la proliferación, la viabilidad y la diferenciación de células hematopoyéticas progenitoras, para lo cual empleamos como modelo a la línea celular mieloide 32D.

Asimismo se ha reportado, que en ratas alimentadas con una dieta a base de caseína se disminuye la carcinogenesis de colon inducida con azoximetano (Tatsuta et al, 1992), y que las casomorfina inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer de seno y próstata (Kampa et al, 1996, Hatzoglou et al 1996), por lo tanto, para explorar un potencial uso terapéutico en células hematopoyéticas transformadas, determinamos los efectos de los compuestos en la línea celular de leucemia mielomonocítica WEHI-3.

Otro aspecto abordado en el trabajo, es el proponer un mecanismo de acción de los compuestos en las células en estudio. Conociendo que los péptidos empleados actúan mediante receptores opioides (Hatzoglou et al, 2000) e incluso se ha propuesto que la β -caseína también utiliza esa vía (Wong et al, 1996), una primera opción fue determinar si el

CasNa, las caseínas o las casomorfinas, en las células en estudio actúan mediante receptores opioides, para ello empleamos el antagonista opioide Naloxone. Por último, también se ha reportado que la caseína y el CasNa induce la producción de G-CSF y M-CSF, por lo que determinamos mediante ensayos de colonias en agar, el uso de anticuerpo y ensayos de RT-PCR, la producción y participación de algún factor de crecimiento hematopoyético en la proliferación de las células 32D tratadas con CasNa.

4. OBJETIVOS GENERALES

- 1) Evaluar sí el CasNa, la α -, β - y κ -caseína, así como la 90-95 α -casomorfina, 1-5 β -casomorfina y 1-7 β -casomorfina alteran la proliferación e inducen diferenciación de la línea celular mieloide multipotencial 32D y de la línea de leucemia mielomonocítica WEHI-3
- 2) Evaluar sí el efecto de los derivados de la caseína y de las casomorfinas en las células hematopoyéticas en estudio es mediado por receptores opioides
- 3) Evaluar la posible intervención de algún factor de crecimiento hematopoyético (FCH) en los efectos observados en las células utilizadas

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1. LÍNEAS CELULARES

La línea mieloide multipotencial 32D dependiente de IL-3 fue donada por la Dra. T. Hoang (Laboratory of Hemopoiesis and Leukemia, Montreal, Canada), y la línea de leucemia mielomonocítica de ratón WEHI-3 fue adquirida en la ATCC (American Type Culture Collection, TIB-68), ambas se cultivaron en una atmósfera al 5% de CO₂ y 37 C en IMDM (Medio Iscove s Modified Dulbecco s, Gibco BRL NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, HyClone UTA, USA) previamente inactivado a 56 C.

La línea 32D fue mantenida en cultivo a una densidad inicial de 1x10⁵ células/mL y sembrada cada 48 horas en cajas Petri (Fisher Brand, Denmark), además, se adicionaron 0.5 ng/mL de rmlL-3 (R&D System, Minneapolis, USA). La concentración de rmlL-3 empleada fue obtenida después de realizar una curva dosis respuesta de la proliferación con las células 32D. Por otro lado, la línea WEHI-3 fue mantenida en cultivo a una densidad inicial de 3x10⁴ células/mL y sembrada cada 48 horas adicionando β-mercaptoetanol (0.05mM).

5.2. CITOCINAS Y ANTICUERPOS

La interleucina-3 recombinante de ratón (rmlL-3), el factor estimulador de colonias de macrófagos (rmM-CSF) y su anticuerpo (anti-rmM-CSF purified Goat IgG) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (rmGM-CSF) fueron obtenidos de R&D Systems, Minneapolis, USA. El anticuerpo secundario rabbit anti-Goat IgG HRP conjugate fue adquirido de ZYMED, San Francisco CA, USA. El anticuerpo Anti-Fms [(CSF-1 R) extracellular domain], su control de isotipo (Normal rabbit IgG) y el anticuerpo secundario [Goat anti-rabbit IgG (H+L), fluorescein conjugate] fueron obtenidos de UPSTATE NY, USA. El anticuerpo FITC-conjugated rat anti-mouse Ly-6G and Ly-6C (Gr-1) y su control de isotipo (FITC-conjugated rat IgG_{2b,κ}) fueron obtenidos de BD Biosciences Pharmingen San Diego CA, USA.

5.3. CULTIVOS EN PRESENCIA DE CasNa, CASEÍNAS Y CASOMORFINAS

El CasNa (Difco Laboratories, Detroit, USA) las caseínas y las casomorfina (SIGMA Chemical St Louis MO USA) se solubilizaron en PBS (Amortiguador de fosfatos) y se

esterilizaron por autoclave. El CasNa, la α -, β -, y κ -caseína fueron preparados a una concentración de 1mg/10uL, mientras que la 1-5 β -casomorfina, la 1-7 β -casomorfina y la 90-95 α -casomorfina se prepararon a una concentración de 50 mM, y se realizaron diluciones en PBS para llegar a las concentraciones deseadas.

Para los ensayos, las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning NY, USA) a una densidad inicial de 2×10^4 y de 3×10^3 células/mL para las células 32D y para las células WEHI 3 respectivamente, en las condiciones de cultivo ya descritas; al inicio del cultivo se adicionó el CasNa, las caseínas o las casomorfinas. Todos los ensayos incluían como control al vehículo (PBS) y un control absoluto bajo las mismas condiciones, y al menos que se indique otra cosa el tiempo de cultivo fue de 3 días.

5.4. OBJETIVO 1

Proliferación

Incorporación de 3H-timidina: La cuantificación de la incorporación de 3H timidina (Thymidine [Methyl³-H]) K.R. AMTMANN DF, México) se empleó para evaluar la proliferación celular. Brevemente, 16 horas antes del término de los cultivos se adicionó 1 μ Ci/pozo de 3H-timidina, y una vez concluido el cultivo, las placas fueron congeladas a -70°C y descongeladas, nuevamente congeladas y descongeladas una vez más, con el fin de liberar núcleos y despegar la población adherente. Posteriormente, las muestras fueron cosechadas y colocadas en viales con 2 mL de líquido de centelleo (Beckman CA, USA), y se procedió a la lectura en un contador de emisión beta (Beckman LS6500 CA, USA).

Viabilidad

Reducción de MTT: La viabilidad fue evaluada determinando la actividad metabólica mediante la reducción de MTT. Brevemente, las células tratadas con el CasNa, las caseínas o las casomorfinas fueron incubadas en la misma placa de cultivo con 20 μ l de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolo] (SIGMA Chemical St Louis MO USA) diluido en PBS (5 mg/mL) durante 3 h. Las células vivas reductoras del MTT fueron evaluadas en la propia placa con la ayuda de un microscopio invertido (SEDIVAL Mod.56126 CA, USA).

Diferenciación

Diferenciación morfológica: La diferenciación morfológica se evaluó después de realizar un frotis sobre un portaobjetos; el frotis se dejó secar, se cubrió completamente con el colorante Wright (HYCEL DE MÉXICO, DF, México) por 6 minutos, posteriormente se adicionó un volumen igual de la solución tampón y se dejó por 4 minutos más, el lavado se realizó con agua corriente. La identificación de las células blásticas y las células con cierto grado de diferenciación de los linajes monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo fue realizada en base a su tamaño, forma del núcleo y la proporción núcleo-citoplasma (Anexo 1).

Tinciones citoquímicas específicas: Para identificar con mayor precisión los linajes celulares, se realizaron técnicas de tinción citoquímica específicas para el linaje monocito-macrófago (α -naftil acetato esterasa) y para el granulocito-neutrófilo (cloroacetato esterasa) (Sun et al 1984; Li et al 1972).

Citometría de Flujo: Además se determinó la diferenciación por la aparición o el incremento de antígenos de superficie mediante citometría de flujo. De manera general, una vez transcurrido el tiempo de cultivo se colectaron las células de cada tratamiento, el botón fue lavado, y las células fueron incubadas por 30 minutos con la dilución de cada anticuerpo y posteriormente lavadas 2 veces. La cuantificación fue realizada en un citómetro de flujo (FACSCalibur). Para los lavados, diluir los anticuerpos y resuspender las células para su lectura fue empleado PBS-SFB al 2%. Se evaluaron 10, 000 eventos y se emplearon controles de isotipo.

Anti-Fms (CSF-1) extracellular domain (rabbit antisuerum): Este anticuerpo reconoce al receptor del M-CSF presente en macrófagos y monocitos, se empleó IgG de conejo como control de isotipo y un anticuerpo secundario [goat anti-rabbit IgG fluorescein (FITC) conjugate].

FITC-conjugated rat anti-mouse Ly-6G and Ly-6C (Gr-1): Este anticuerpo reconoce al antígeno Gr-1 expresado en granulocitos (Hestdal et al, 1991; Tepper et al, 1992), se empleó FITC-conjugated rat IgG_{2b,κ} como control de isotipo.

5.5. OBJETIVO 2

Efecto del antagonista opioide Naloxone (NLX) en la proliferación: Como primer paso las células 32D y las células WEHI-3 fueron cultivadas con un amplio rango de dosis de NLX (0.01 a 1000 μM), y a las 72 horas de cultivo se evaluó la proliferación por conteo directo con la ayuda de un hemocitómetro para las células 32D y por la técnica de Cristal Violeta (Gilles et al, 1986; Kueng W and Eppenberger, 1989) para las células WEHI-3. En un segundo paso se empleó un rango de dosis menor (16 a 500 μM) y se evaluó la proliferación por incorporación de 3H-timidina. Así se obtuvieron las dosis para emplearse en los ensayos de regresión (31.3 y 62.5 μM).

Regresión del efecto de CasNa, caseínas y casomorfina en las células 32D y WEHI-3 por el NLX: Las células fueron cultivadas en presencia de Naloxone (31.3 y 62.5 μM) y se les adicionó CasNa (0.1 y 0.5 mg/mL), α -, β -, y κ -caseína (0.5 y 1 mg/mL) y 1-5 β -casomorfina (500 μM) a las células 32D, y CasNa, α -, β -caseína (1 y 2 mg/mL), y κ -caseína (0.5 y 1 mg/mL) a las células WEHI-3. La proliferación fue evaluada a las 72 horas mediante la cuantificación de la incorporación de 3H-timidina.

5.6. OBJETIVO 3

Cinética de proliferación: Las células 32D fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning NY, USA), a una densidad inicial de 2×10^4 células/mL en las condiciones de cultivo ya descritas y en presencia de 2 mg/mL de CasNa por 0, 1, 2, 3 y 4 días; al término de cada tiempo de cultivo se evaluó la proliferación y la viabilidad. Además, fueron colectados los sobrenadantes de los cultivos almacenándolos a -70°C hasta su uso.

Actividad formadora de colonias de los sobrenadantes de los cultivos: La presencia de algún factor estimulador de colonias en los sobrenadantes colectados, fue evaluada mediante la formación de colonias por el método de doble capa de agar, empleando células de médula ósea de ratón (Pluznick y Sachs, 1966). Brevemente, la primera capa contiene el sobrenadante a evaluar, suero de equino (SE), IMDM 1X, IMDM 2X y agar (30 mg/mL de H_2O), 20% de cada uno. La segunda contiene 50% de IMDM 1X, 10% de SE, 20% de IMDM 2X, 20% de agar (18 mg/mL) y 100,000 células de médula ósea obtenidas de fémures de ratones CD-1. Después de 7 días de cultivo se evalúa la actividad

hematopoyética de los sobrenadantes por su capacidad para generar colonias (> 50 células).

Identificación de las colonias generadas: La identificación de las colonias generadas en la doble capa de agar fue realizada de la siguiente manera, la capa superior de agar la cual contiene las colonias, fue extraída de cada pozo con la ayuda de un papel filtro cortado a la medida del pozo, ésta fue colocada sobre un porta objeto y se dejó secar por 24 horas para las tinciones respectivas. Para la identificación morfológica, las colonias fueron fijadas con metanol y teñidas con Giemsa (SIGMA Chemical St Louis MO USA). Para identificar con mayor precisión los linajes celulares, se realizaron tinciones citoquímicas para el linaje monocito-macrófago (α -naftil acetato esterasa) y para el granulocito-neutrófilo (cloroacetato esterasa).

Inhibición de la actividad formadora de colonias: Para inhibir la actividad formadora de colonias en los ensayos de agar se empleó el anticuerpo α -rmM-CSF (4 μ g) adicionándolo al inicio del cultivo, además se utilizaron como controles rmM-CSF (20 ng) y rmGM-CSF (2.5 ng) en ausencia o presencia del anticuerpo.

Detección de M-CSF por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos de 32D en presencia de CasNa: El ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) se realizó en inmunoplasmas (Corning NY, USA). Brevemente, en los pozos de las inmunoplasmas se adicionó 100 μ L del sobrenadante a evaluar incubando 2 horas a 37°C y a 4°C toda la noche, las placas fueron lavadas con 0.1 % de polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20) en PBS (Tween/PBS, solución de lavado), se bloqueó llenando el pozo con BSA al 2% en Tween/PBS (solución de bloqueo) por 3 horas a 37°C. Después de lavar fue adicionado el anticuerpo primario (goat-anti rmM-CSF) diluido (1:500) en la solución de bloqueo por 3 horas a 37°C se volvió a lavar, y fue adicionado el anticuerpo secundario (rabbit anti-Goat IgG HRP conjugate) diluido (1:500) en la solución de bloqueo por 3 horas a 37°C, finalmente, fue adicionado el sustrato (OPD, o-phenylenediamina; SIGMA Chemical, St Louis MO USA) diluido (0.5 mg/mL) en el amortiguado de citratos, adicionando O₂H₂ (1%) y el ensayo fue evaluado en un lector de placas (Tecan) a 490 nM. El amortiguador de citratos se preparó según la literatura (Coligan, et al 1992)

Evaluación de la presencia de ARNm para el M-CSF y su receptor (M-CSFR) por RT-PCR. Extracción de ARN: La extracción se realizó con TRIZOL (Trizol reagent Invitrogen Life Technologies CA, USA). Brevemente, las células 32D (1×10^5) fueron cultivadas en presencia de CasNa 2mg/mL o PBS por 36, 48 y 60 horas para M-CSF o por 24 horas para M-CSFR, en cajas Petri Fisherbrand en las condiciones de cultivo ya descritas. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, lisadas con 1 mL de TRIZOL y 200 μ L de cloroformo, la fase acuosa se precipitó con isopropanol y el botón fue resuspendido en 15 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (H_2O DEPEC). La cuantificación fue realizada a una longitud de onda de 260 nm después de calentar el ARN por 5 min a 65 C y diluirlo 1:1000 en H_2O DEPEC. La integridad del ARN obtenido fue comprobada mediante el corrimiento de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

RT-PCR para detectar el ARNm de M-CSF y M-CSFR de ratón: Para la retrotranscripción reversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se utilizó el kit de PERKIN ELMER (GeneAmp RNA PCR N808-0017, New Jersey USA). Los oligonucleotidos utilizados en la PCR fueron los siguientes, para β -actina GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG y GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG que da un producto de 250 pares de bases (250 pb). Para el M-CSF y su receptor se emplearon los reportados por Raivich G (Raivich, et al 1998) TCGACATGGCTGGGCTCCC y ATCAGGCTTGGTCACCCACATC para M-CSF que da un producto de 527pb, y para el M-CSFR fueron TTG TAC CGA GCT TGA AGA CCC y AGC CTT GAG ACT GAG AGC CC que da un producto de 552 pb. Se utilizó un termociclador marca GENIUS Techne Modelo-FGEN05TP. La RT duró 60 min a 42 C y 10 min a 90 C. Para la PCR fueron 105 seg a 95 C, 35 ciclos de (15 seg a 95 C y 30 seg a 60 C) y 7 min a 72 C. El producto obtenido se visualizó en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

5.7. MANEJO Y PRESENTACIÓN DE DATOS

Todos los experimentos fueron realizados cuando menos tres veces de manera independiente. Los ensayos de Cristal Violeta e incorporación de 3H timidina fueron realizados por cuadruplicado, los ensayos de conteo directo y viabilidad fueron realizados por triplicado, los ensayos de agar y las determinaciones morfológicas y citoquímicas fueron realizados por duplicado. Los datos de proliferación y viabilidad son presentados como porcentaje respecto al un control absoluto y se les realizó una prueba t de Student

como porcentaje respecto al un control absoluto y se les realizó una prueba t de Student ($P < 0.05$ y 0.01 , respecto al cultivo con solo vehículo) realizándose previamente una prueba F para determinar si las varianzas son iguales o diferentes, se expresa la media y su desviación estándar. En las evaluaciones morfológicas y citoquímicas se contaron 200 células por preparación, son expresadas con la media y su desviación estándar y se les realizó la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon ($P < 0.05$).

6. RESULTADOS

6.1. OBJETIVO 1. EVALUAR SÍ EL CasNa, LA α -, β - y κ -CASEÍNA, ASÍ COMO LA 90-95 α -CASOMORFINA, 1-5 β -CASOMORFINA Y 1-7 β -CASOMORFINA ALTERAN LA PROLIFERACIÓN E INDUCEN DIRENCIACIÓN DE LA LÍNEA MIELOIDE MULTIPOTENCIAL 32D Y DE LA LÍNEA DE LEUCEMIA MIELOMONOCÍTICA WEHI-3

Proliferación

Para analizar la proliferación de las células 32D y WEHI-3 en presencia de el CasNa, las caseínas y las casomorfina, se realizaron ensayos dosis-respuesta por 72 horas de cultivo determinando la síntesis de ADN, mediante la evaluación de la incorporación de 3H-timidina.

En la línea celular progenitora mieloide 32D, el CasNa presentó el mayor efecto, ya que a partir de 0.1 mg/mL reduce significativamente la proliferación con respecto al control, y con dosis mayores a 0.5 mg/mL la proliferación es menor a 20%. Al igual que el CasNa, pero en menor proporción 0.1 mg/mL de β -caseína disminuye la proliferación, pero son necesarios 2 mg/mL para reducirla en más del 50%. Para el caso de α - y κ -caseína, la reducción fue significativa a partir de 0.5 mg/mL y desde 1 mg/mL la proliferación fue cercana al 50 % (figura 6 y 7).

En lo que respecta a la línea de leucemia mielomonocítica WEHI-3, sólo a partir de 1 mg/mL, el CasNa, la α - y la β -caseína reducen significativamente la proliferación. Destacando que a diferencia de las células 32D únicamente con la dosis de 4mg/mL de CasNa la proliferación fue menor del 50%. Por su parte, κ -caseína presentó el mayor efecto en las células WEHI-3, disminuyendo significativamente la proliferación a partir de 0.5 mg/mL, y con 1 mg/mL la proliferación es de solo 27% y de 5% con 2 mg/mL (figura 6 y 7).

Para determinar la proliferación de las células en presencia de las casomorfina, se realizaron ensayos con dosis desde 0.01 μ M hasta 500 μ M para 90-95 α -casomorfina, y hasta 1000 μ M para 1-5 y 1-7 β -casomorfina (figura 8). La 90-95 α -casomorfina no alteró significativamente la proliferación de las líneas celulares empleadas. La 1-5 β -casomorfina afectó a las células 32D reduciendo hasta en un 50% la proliferación con 1000 μ M. Mientras que, la 1-7 β -casomorfina disminuyó significativamente la proliferación de ambas líneas celulares pero sólo con la dosis de 1000 μ M y la reducción fue menor al 15%.

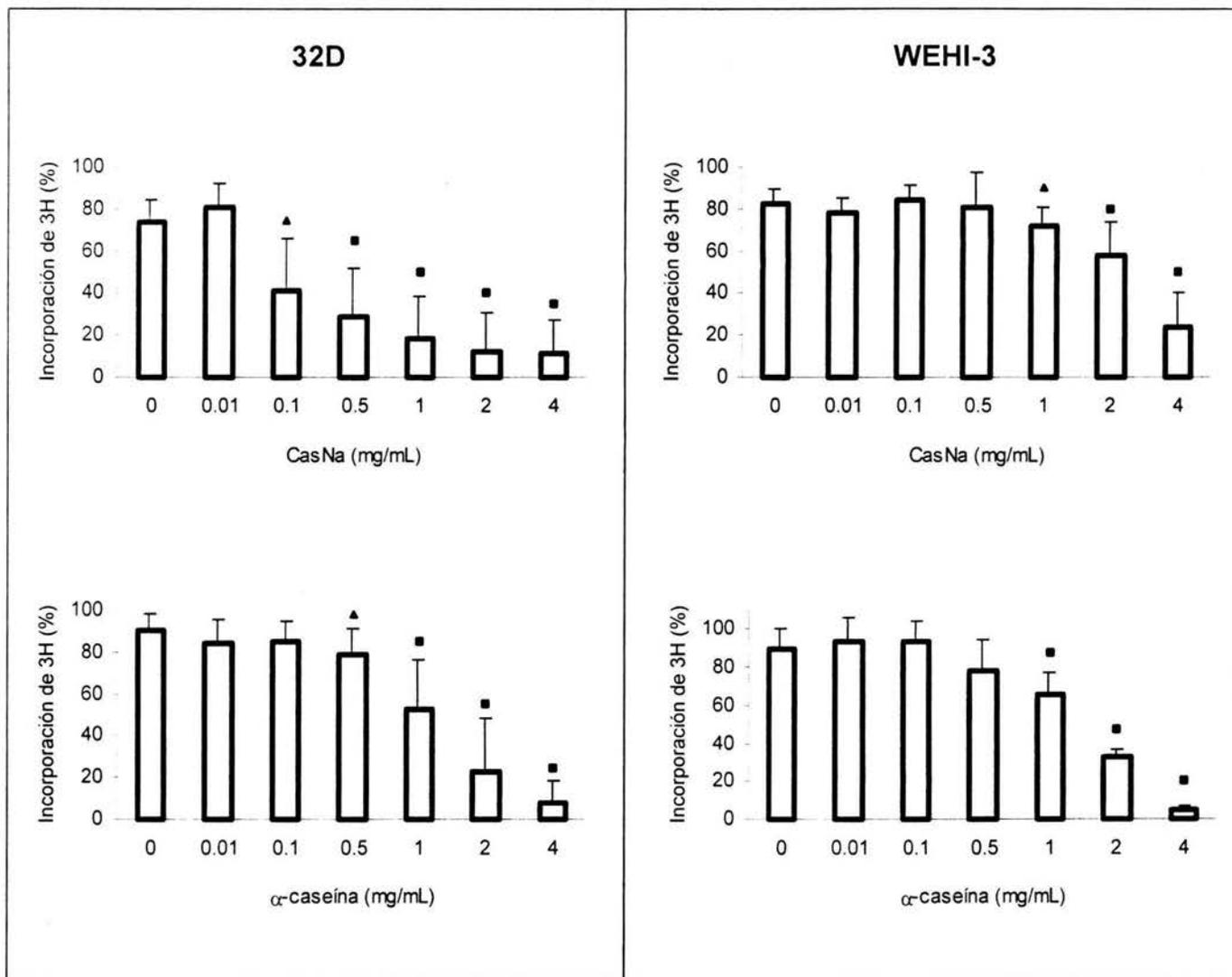


Figura 6. Proliferación de las células 32D y WEHI-3 en presencia de CasNa y caseínas. Las células 32D y WEHI-3 fueron cultivadas por 72 horas con varias dosis (mg/mL) de CasNa y α-caseína. La proliferación fue evaluada por incorporación de 3H-timidina. Diferencia significativa (▲ P < 0.05 y ■ P < 0.01) con respecto a 0 mg/mL. Se expresa la media y su desviación estándar.

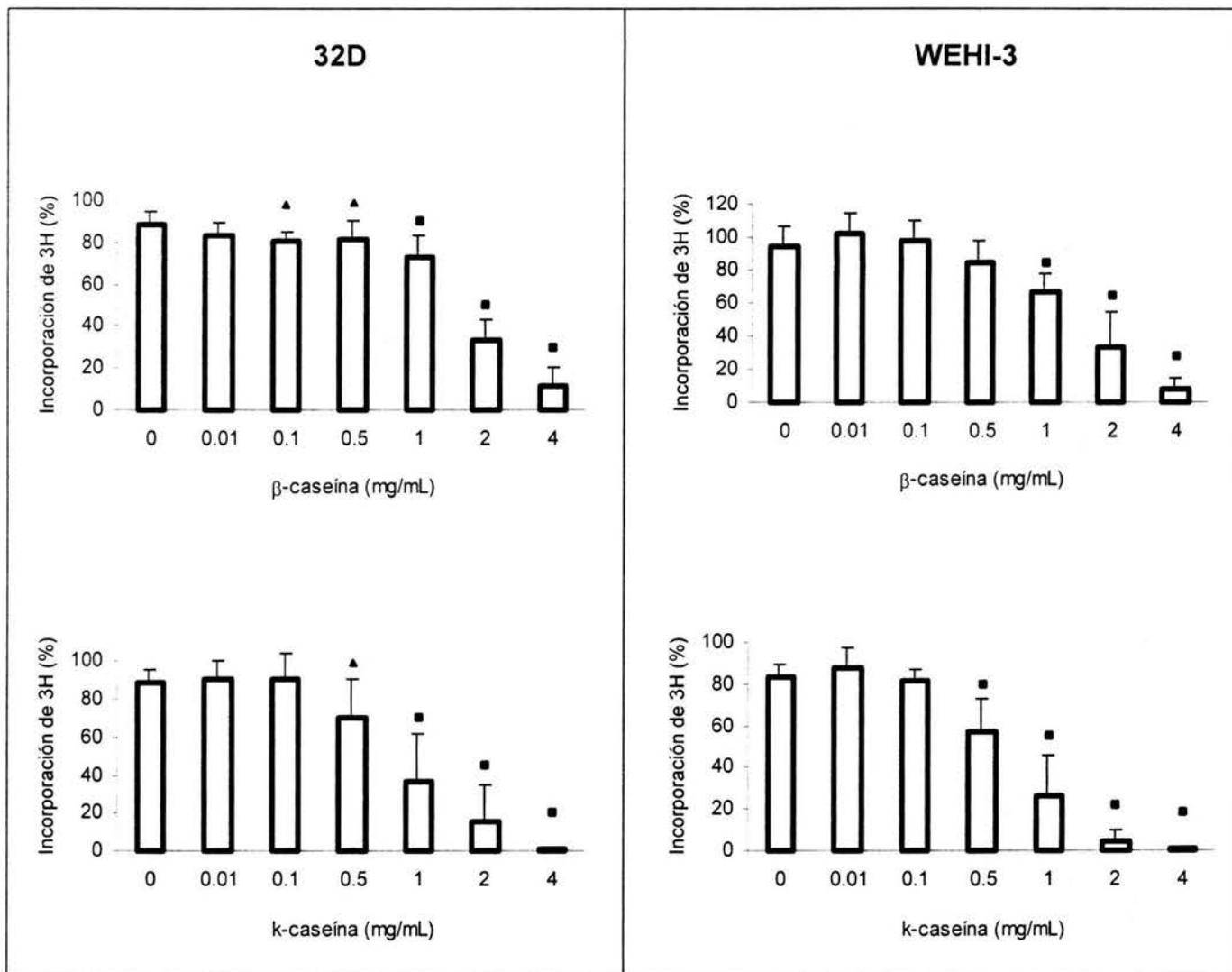


Figura 7. Proliferación de células 32D y WEHI-3 en presencia de caseínas. Las células 32D y WEHI-3 fueron cultivadas por 72 horas con varias dosis de β - y κ -caseína (mg/mL). La proliferación fue evaluada por incorporación de 3H-timidina. Diferencia significativa ($\blacktriangle P < 0.05$ y $\blacksquare P < 0.01$) con respecto a 0 mg/mL. Se expresa la media y su desviación estándar.

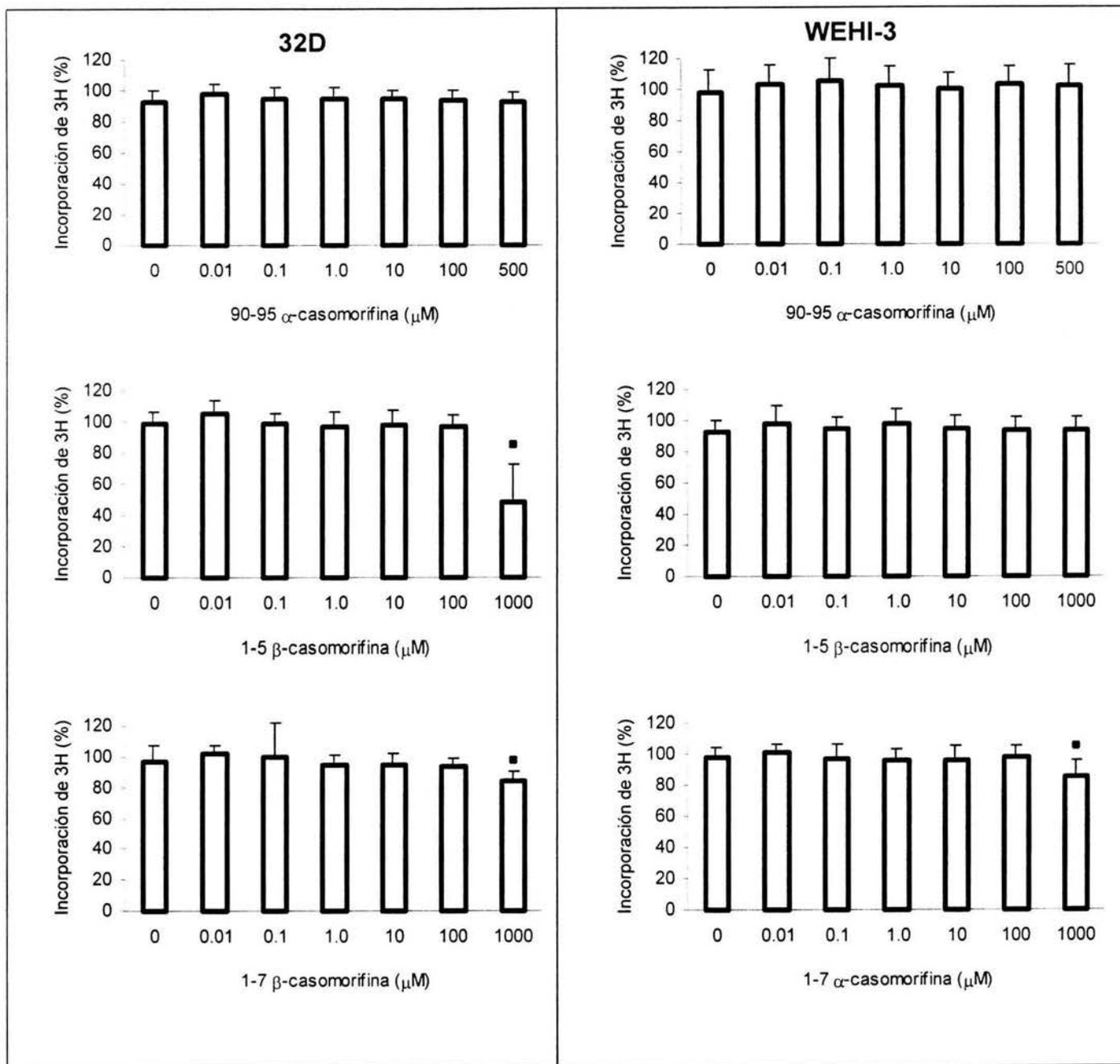


Figura 8. Proliferación de las células 32D y WEHI 3 en presencia de casomorfina. Las células 32D (A) y las células WEHI-3 (B) fueron cultivadas por 72 horas con varias dosis (μM) de 90-95 α-casomorfina, 1-5 β-casomorfina y 1-7 β-casomorfina. La proliferación fue evaluada por incorporación de 3H-timidina. Diferencia significativa (▲ P < 0.05 y ■ P < 0.01) con respecto a 0 μM. Se expresa la media y su desviación estándar.

Viabilidad

Para descartar que la reducción en la proliferación por los compuestos empleados sea consecuencia de citotoxicidad, se evaluó la actividad mitocondrial como parámetro de viabilidad.

En las células 32D, a partir de la dosis de 1 mg/mL de CasNa y de 2 mg/mL para las caseínas, se disminuyó significativamente la viabilidad, pero ésta siempre fue cercana o mayor al 90%, a excepción de la dosis de 4 mg/mL de β -caseína donde la viabilidad fue del 72% (figura 9). A diferencia de las células 32D, en las células WEHI-3 la viabilidad se vio significativamente afectada con 2 mg/mL de CasNa y 1 mg/mL de las caseínas (figura 10), aunque a estas dosis la viabilidad fue también cercana al 90%, sin embargo, con la dosis más alta (4 mg/mL) la viabilidad en las células WEHI-3 fue más disminuida, siendo más evidente en β - y κ -caseína, en las cuales la viabilidad es de sólo 31.6 y 14.6 % respectivamente.

También, se determinó la viabilidad de las células con las dos dosis más altas (100 y 1000 μ M) de las casomorfina que disminuyeron la proliferación. Únicamente la dosis de 1000 μ M de la 1-5 β -casomorfina afectó la viabilidad de las células 32D, y aunque significativamente ésta fue del 95%. Mientras que la 1-7 β -casomorfina no alteró la viabilidad de las células 32D o de las células WEHI-3 (figura 11).

En resumen, a excepción de las dosis más altas de CasNa y caseínas, en ambas líneas celulares la viabilidad siempre fue cercana al 90%, por lo tanto, esto indica que la reducción en la proliferación por las demás concentraciones no se debe a muerte celular provocada por los compuestos.

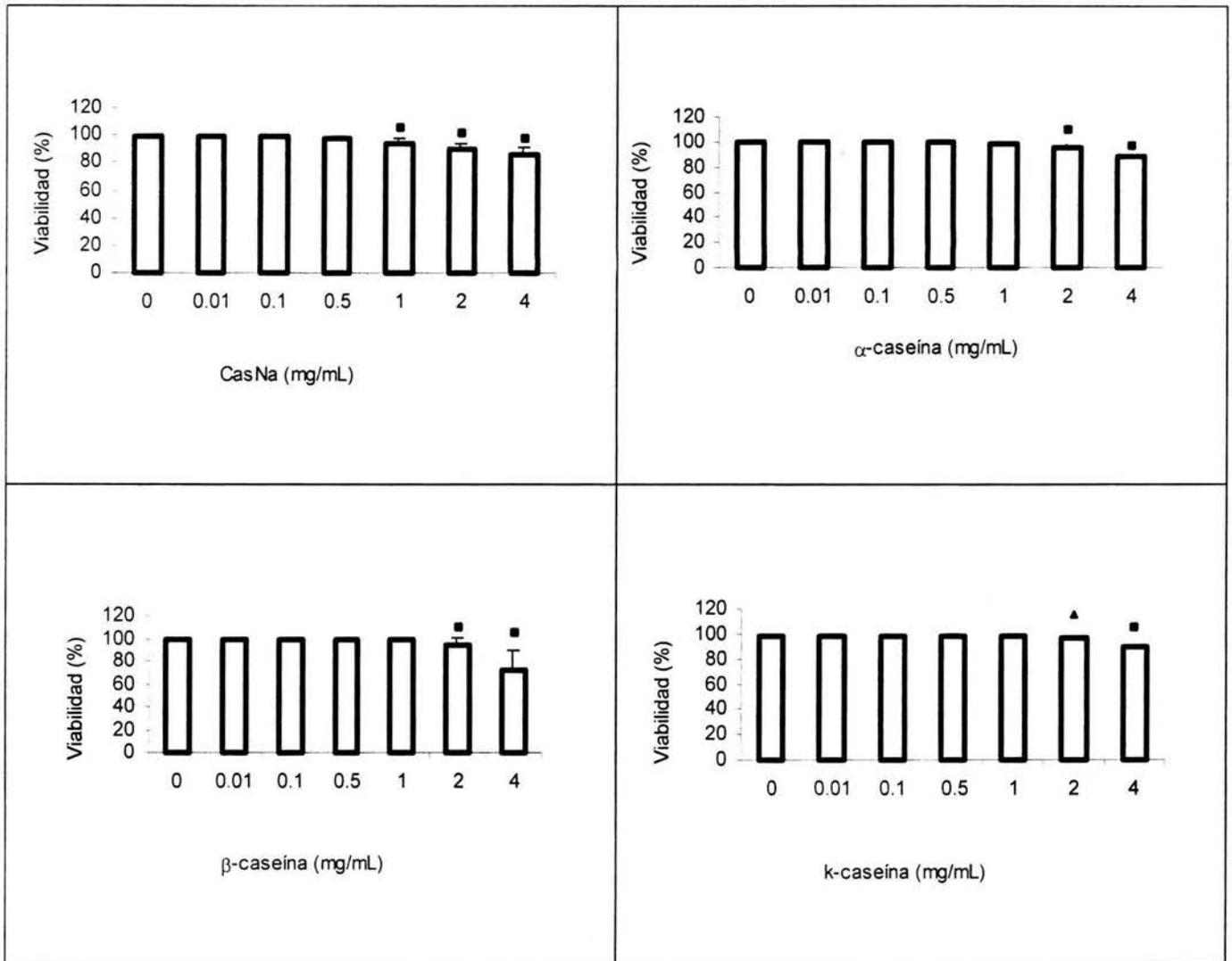


Figura 9. Viabilidad de la línea celular 32D en presencia de CasNa y caseínas. Las células 32D fueron cultivadas por 72 horas con varias dosis de CasNa, α -, β - y κ -caseína (mg/mL). La viabilidad fue evaluada por reducción de MTT. Diferencia significativa (▲ P < 0.05 y ■ P < 0.01) con respecto a 0 mg/mL. Se expresa la media y su desviación estándar.

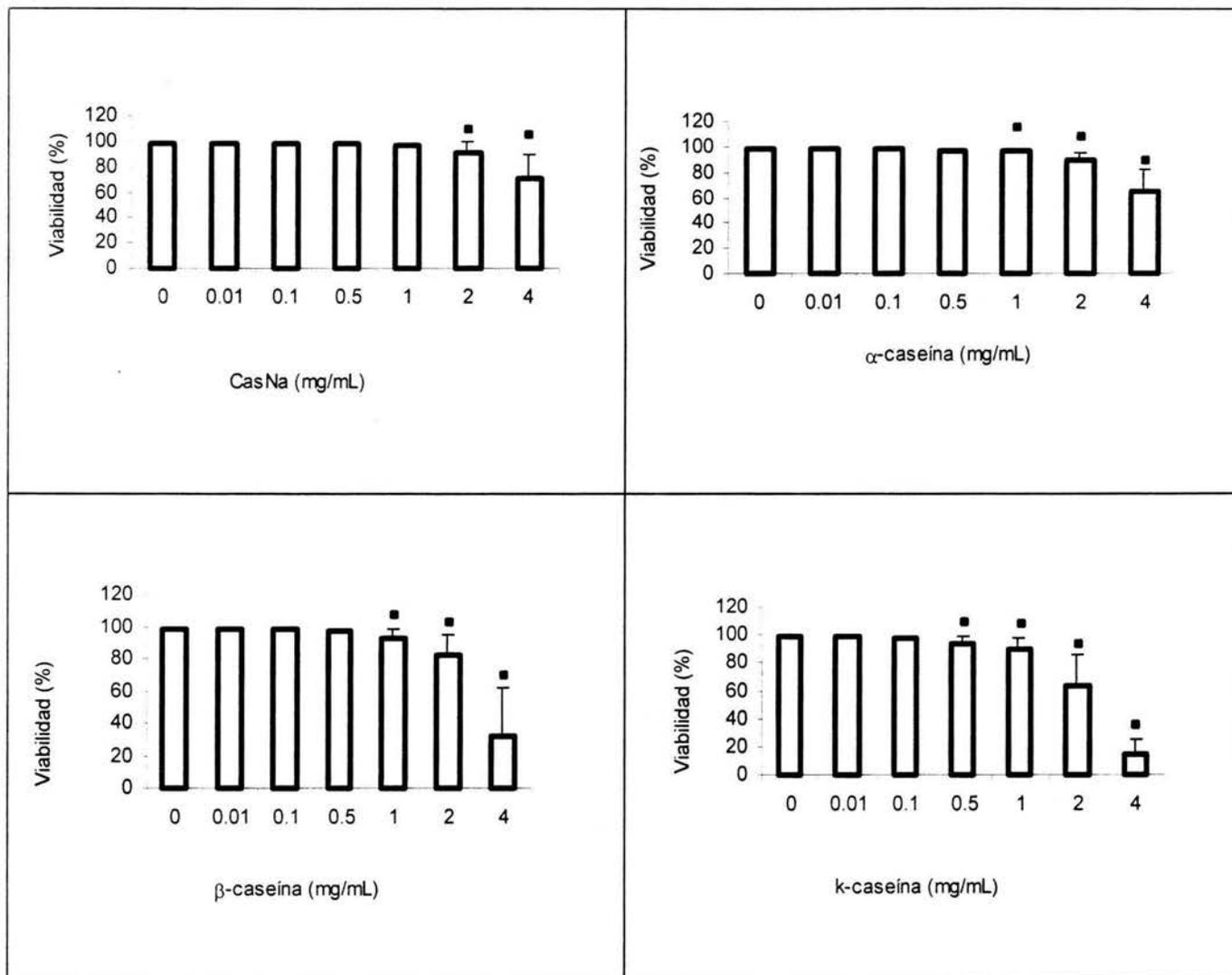


Figura 10. Viabilidad de la línea celular WEHI-3 en presencia de CasNa y caseínas. Las células WEHI 3 fueron cultivadas por 72 horas con varias dosis de CasNa, α-, β- y κ-caseína (mg/mL). La viabilidad fue evaluada por reducción de MTT. Diferencia significativa (▲ P < 0.05 y ■ P < 0.01) con respecto a 0 mg/mL. Se expresa la media y su desviación estándar.

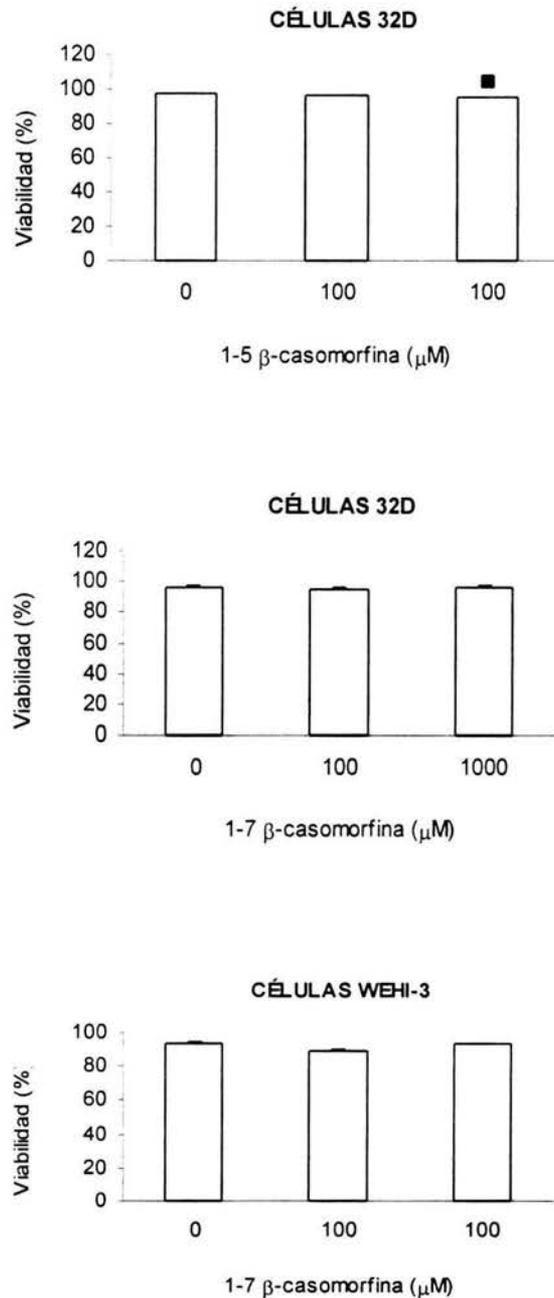


Figura 11. Viabilidad de las células 32D y WEHI-3 en presencia de casomorfinas. Las células 32D fueron cultivadas en presencia de 1-5 β -casomorfina y 1-7 β -casomorfina, y las células WEHI-3 en presencia de 1-5 β -casomorfina. La viabilidad fue evaluada por reducción de MTT a las 72 horas de cultivo. Diferencia significativa ($\blacktriangle P < 0.05$ y $\blacksquare P < 0.01$) con respecto a 0 μM . Se expresa la media y su desviación estándar.

Diferenciación

A) Morfología

El efecto en la diferenciación se determinó primeramente, evaluando la morfología de las células mediante tinciones con el colorante Wright. Para determinar el linaje y el estadio de diferenciación, se emplearon criterios como el tamaño y la forma del núcleo, la relación núcleo/citoplasma y las características del citoplasma (anexo 1). Las concentraciones de los compuestos empleadas fueron aquellas que afectaron la proliferación, pero la viabilidad fue superior al 90%. Por lo que, además de un cultivo con solo vehículo las células 32D se cultivaron por 72 horas en presencia de 0.1, 0.5 y 1 mg/mL de CasNa, 0.5, 1 y 2 mg/mL de α - , β - y κ -caseína y 1 mM de 1-5 y 1-7 β -casomorfina. Mientras que las células WEHI-3 se cultivaron en presencia de 0.5, 1 y 2 mg/mL de CasNa, α - y β -caseína, 0.1, 0.5 y 1 mg/mL de κ -caseína, y 1mM de 1-5 β -casomorfina.

En los cultivos control de las células 32D, 45% son blastos, 49% granulocitos (promielocito/mielocito, metamielocito, banda y neutrófilo) y casi un 6% son monocitos (promonocito y monocito) (tabla 5). Cuando son tratadas con CasNa, hay un aumento significativo en los porcentajes de las células con características del linaje monocito-macrófago (22, 45 y 46% con 0.1, 0.5 y 1 mg/mL respectivamente), y una disminución en los porcentajes de células blásticas y en células del estadio promielocito-mielocido. (tabla 5 y figura 12)

Al igual que con CasNa, existió diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de las células 32D en presencia de las caseínas, pero en las tres caseínas fue significativa sólo con la dosis de 1 y 2 mg/mL (tabla 5 y figura 12). Asimismo, las tres caseínas disminuyeron los porcentajes de las células blásticas y las del estadio promielocito-mielocito, pero también en menor proporción que el CasNa, e incluso con α -caseína la disminución en el porcentaje de blastos no es significativa. Con respecto a las casomorfinas (1-5 y 1-7 β -casomorfina) que disminuyeron la proliferación de las células 32D, no presentaron efectos significativos en la morfología de estas células (tabla 5).

Por otro lado, en los cultivos control de las células WEHI-3 existen 23% de blastos, 78% de granulocitos (promielocito/mielocito, metamielócito, banda y neutrófilo) y un 5% de monocitos (promonocito y monocito) (tabla 6). Pero, a diferencia de las células 32D, en las células WEHI-3 cuando son tratadas con CasNa no hay un cambio en las características

morfológicas aun con la dosis de 2 mg/mL (de 78 a 70% en granulocitos y de 5 a 7% en los monocitos) y la población blástica se mantienen semejante al control (arriba del 20%). Con respecto a las caseínas y 1-7 β -casomorfina, tampoco hay diferencias relevantes al compararse con el cultivo control de las células WEHI-3 (tabla 6), a excepción de la dosis de 2 mg/mL de β - y κ -caseína que aunque de manera significativa aumentan muy ligeramente los promonocitos (a 9 y 11% respectivamente) y disminuye el porcentaje de blastos y promonocitos-mielocitos, además, la κ -caseína presenta un incremento significativo de 33.3 a 40.2% en el estadio en banda.

Por lo anterior, la apreciación morfológica indica que el CasNa y las caseínas incrementan los porcentajes de células del linaje monocito-macrófago en las células 32D, sin embargo, a excepción de un ligero incremento en granulocitos y promonocitos con 2mg/mL de κ -caseína y de promonocitos con β -caseína, las células WEHI-3 no sufren cambios morfológicos con alguno de los compuestos.

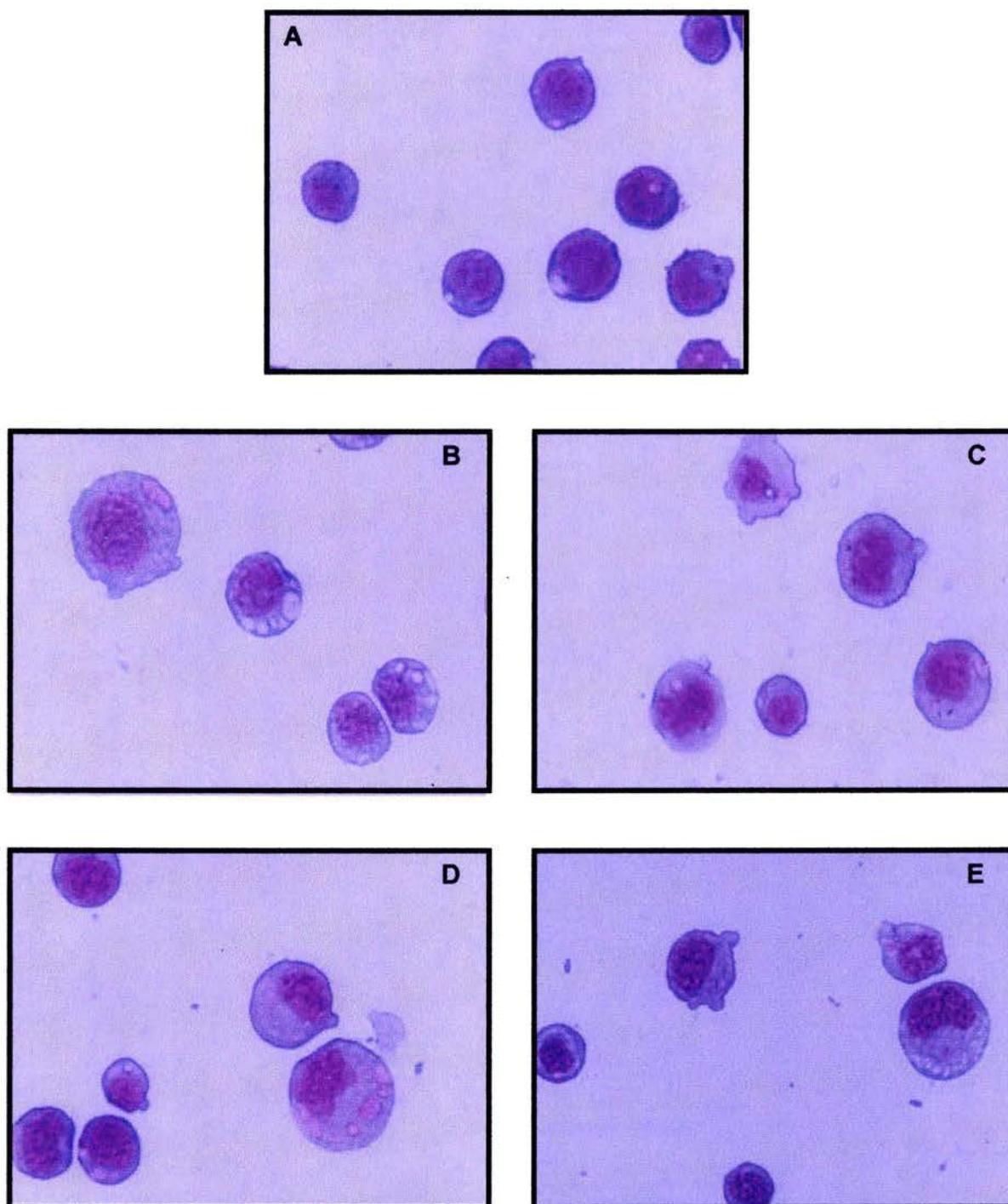


Figura 12. Morfología de las células 32D en presencia de CasNa y caseínas (400X). Las células 32D fueron cultivadas por 72 horas con A) solo vehículo o B) en presencia de 1 mg/mL de CasNa o 2mg/mL de C) α -caseína, D) β -caseína y E) κ -caseína. La morfología fue determinada mediante tinciones con el colorante Wright.

Concentración (mg/mL)	TOTAL BLASTOS	GRANULOCITO-NEUTRÓFILO						MONOCITO-MACRÓFAGO		
		Promielocito/ Mielocito	Metamielócito	Banda	Neutrófilo	TOTAL	Promonócito	Monocito	TOTAL	
0.0	44.7 ± 6.3	32.6 ± 3.2	13.13 ± 6.2	3.7 ± 2.1	0.1 ± 0.2	49.2 ± 5.4	5.4 ± 1.0	0.2 ± 0.5	5.7 ± 0.9	
CasNa 0.1	41.5 ± 10.7	23.0 ± 1.6▲	11.0 ± 7.8	1.7 ± 0.3	0.5 ± 0.6	36.3 ± 6.9	18.5 ± 2.4▲	3.7 ± 2.2▲	22.2 ± 4.2▲	
0.5	26.0 ± 13.4▲	14.0 ± 8.5▲	13.3 ± 5.1	0.7 ± 0.6	0.5 ± 0.6	28.5 ± 12.9▲	24.7 ± 3.9▲	20.8 ± 14.7▲	45.5 ± 16.7▲	
1	19.4 ± 16.2▲	6.6 ± 2.0▲	11.2 ± 7.6	0.6 ± 0.7	0.3 ± 0.3	18.7 ± 6.6▲	27.9 ± 8.8▲	33.9 ± 20.6▲	46.4 ± 12.2▲	
α-caseína 0.5	40.5 ± 2.9	19.3 ± 7.8▲	24.0 ± 11.2	5.0 ± 1.5	1.9 ± 1.1	49.7 ± 4.5	8.8 ± 3.1	1.0 ± 1.3	9.8 ± 2.5	
1.0	36.6 ± 2.7	22.7 ± 6.8▲	22.5 ± 11.5	6.1 ± 1.3	0.5 ± 0.6	51.9 ± 5.9	10.4 ± 6.7	2.1 ± 0.6▲	12.5 ± 6.3▲	
2.0	38.3 ± 1.1	24.5 ± 0.1▲	8.5 ± 2.6	5.9 ± 0.3	0.0 ± 0.0	38.8 ± 2.9▲	19.3 ± 1.3▲	3.5 ± 3.0▲	22.8 ± 1.7▲	
β-caseína 0.5	40.0 ± 7.5	23.7 ± 8.3▲	22.2 ± 14.6	6.1 ± 2.6	0.3 ± 0.2	50.5 ± 8.9	7.7 ± 3.7	1.86 ± 3.4	9.5 ± 3.5	
1.0	23 ± 5.5▲	12.8 ± 9.7▲	28.1 ± 14.2	7.6 ± 1.5	1.7 ± 1.5	50.2 ± 7.5	18.8 ± 6.8▲	8.0 ± 4.6▲	26.8 ± 2.8▲	
2.0	26.0 ± 12.0	11.5 ± 9.6▲	21.2 ± 10.5	3.9 ± 1.6	0.5 ± 0.9	37.1 ± 2.9▲	14.6 ± 4.4▲	22.3 ± 13.5▲	37.0 ± 9.5▲	
κ-caseína 0.5	36.8 ± 9.6	25.7 ± 10.1	19.3 ± 6.7	4.0 ± 1.7	0.1 ± 0.2	49.2 ± 2.6	11.4 ± 8.4	2.6 ± 3.2	14.0 ± 11.5	
1.0	26.7 ± 6.2▲	20.3 ± 5.4▲	25.8 ± 9.1	5.7 ± 0.8	0.5 ± 0.5	52.3 ± 5.8	16.9 ± 3.4▲	4.8 ± 4.1▲	15.8 ± 5.9▲	
2.0	28.5 ± 3.6▲	15.2 ± 11.4▲	23.8 ± 5.3	5.8 ± 1.8	0.0 ± 0.0	44.8 ± 4.5	18.5 ± 1.4▲	8.2 ± 7.7▲	20.1 ± 7.9▲	
1-5 βcas 1.0 mM	50.2 ± 6.0	23.5 ± 10.0	17.5 ± 3.2	3.8 ± 1.2	0.0 ± 0.0	45.6 ± 6.1	6.5 ± 1.1	0.1 ± 0.3	6.6 ± 1.2	
1-7 βcas 1.0 mM	53.3 ± 8.3	24.2 ± 9.6	14.2 ± 3.5	5.4 ± 1.8	0.0 ± 0.0	43.8 ± 6.3	3.6 ± 2.5	0.0 ± 0.0	3.6 ± 2.5	

Tabla 5. Diferenciación de las células 32D en presencia de CasNa, caseínas y casomorfinas (Morfología). Las células 32D fueron cultivadas por 72 horas en presencia de CasNa y caseínas y se evaluó la morfología mediante tinciones con el colorante Wright. Se anotan promedios y D.S. (▲ = p < 0.05) con respecto a 0.0 mg/mL.

Concentración (mg/mL)	BLASTOS TOTAL	GRANULOCITO-NEUTRÓFILO						MONOCITO-MACRÓFAGO		
		Promielocito/ Mielocito	Metamielocito	Banda	Neutrófilo	TOTAL	Promonócito	Monocito	TOTAL	
0.0	23.2 ± 4.9	35.9 ± 4.2	33.3 ± 9.4	2.5 ± 1.5	0.1 ± 0.2	71.7 ± 5.4	5.1 ± 1.9	0.0 ± 0.0	5.1 ± 1.9	
CasNa 0.1	29.1 ± 10.6	39.3 ± 2.5	25.4 ± 9.9	2.1 ± 0.6	0.0 ± 0.0	66.8 ± 9.0	4.1 ± 2.0	0.0 ± 0.0	4.1 ± 2.0	
0.5	27.1 ± 10.3	34.5 ± 3.8	28.4 ± 10.9	3.1 ± 1.4	0.0 ± 0.0	66.1 ± 3.0	6.9 ± 4.0	0.0 ± 0.0	6.9 ± 4.0	
1	21.7 ± 6.4	38.6 ± 8.0	30.8 ± 11.2	2.4 ± 0.8	0.0 ± 0.0	69.8 ± 2.5	6.6 ± 3.1	0.0 ± 0.0	6.6 ± 3.1	
α-caseína 0.5	23.2 ± 1.0	37.1 ± 4.5	29.4 ± 4.3	3.2 ± 1.8	0.0 ± 0.0	69.8 ± 1.7	7.0 ± 0.7	0.0 ± 0.0	7.0 ± 0.7	
1.0	20.8 ± 5.6	35.7 ± 2.7	35.1 ± 9.3	2.9 ± 1.3	0.0 ± 0.0	73.7 ± 7.7	5.5 ± 2.7	0.0 ± 0.0	5.5 ± 2.7	
2.0	21.0 ± 5.6	34.1 ± 1.7	36.9 ± 9.3	3.8 ± 1.2	1.0 ± 0.0	68.8 ± 0.4	4.3 ± 1.9	0.0 ± 0.0	4.3 ± 1.9	
β-caseína 0.5	20.8 ± 5.7	35.3 ± 7.2	35.9 ± 9.5	2.8 ± 1.0	0.0 ± 0.0	73.9 ± 4.4	5.3 ± 1.9	0.0 ± 0.0	5.3 ± 1.9	
1.0	20.7 ± 5.6	35.7 ± 6.1	34.7 ± 10.3	3.7 ± 2.1	0.0 ± 0.0	74.1 ± 6.2	5.2 ± 0.7	0.0 ± 0.0	5.2 ± 0.7	
2.0	15.7 ± 3.0▲	32.9 ± 4.7	38.0 ± 8.1	4.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0	74.9 ± 3.7	9.4 ± 0.7▲	0.0 ± 0.0	9.4 ± 0.7▲	
κ-caseína 0.5	19.2 ± 1.1	31.9 ± 2.7	38.9 ± 3.0	2.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	73.3 ± 0.4	7.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	7.5 ± 0.7	
1.0	21.2 ± 7.9	39.1 ± 5.0	30.9 ± 10.3	2.4 ± 0.8	0.2 ± 0.5	71.1 ± 6.8	6.2 ± 1.6	0.0 ± 0.0	6.2 ± 1.6	
2.0	13.2 ± 2.5▲	27.7 ± 1.1▲	40.2 ± 7.5▲	7.0 ± 3.8	0.5 ± 0.4	75.6 ± 5.6	11.4 ± 3.1▲	0.0 ± 0.0	11.4 ± 3.1▲	
1-5 βcas 1.0 mM	22.2 ± 3.9	33.4 ± 4.1	38.3 ± 7.2	2.4 ± 1.1	0.0 ± 0.0	74.1 ± 5.7	4.3 ± 1.6	0.0 ± 0.0	4.3 ± 1.6	

Tabla 6. Diferenciación de las células WEHI-3 en presencia de CasNa, caseínas y casomorfinas (Morfología). Las células WEHI-3 fueron cultivadas por 72 horas en presencia de CasNa y caseínas y se evaluó la morfología mediante tinciones con el colorante Wright. Se anotan promedios y D.S. (▲=p< 0.05) con respecto a 0.0 mg/mL.

B) Citoquímica

Además de la morfología se realizaron tinciones citoquímicas específicas. La tinción α -naftil acetato esterasa para el linaje monocito-macrófago y la tinción cloroacetato esterasa para el linaje granulocito-neutrófilo, se utilizó la línea celular monocítica P-388 y células de médula ósea como controles para las tinciones (figura 13A y 13B).

Los resultados de las tinciones indican que las células 32D tratadas con CasNa presentaron el mayor porcentaje de células positivas del linaje monocito-macrófago aumentando significativamente de 4 a 10, 26 y 32% con 0.1, 0.5 y 1 mg/mL respectivamente (figura 14 y figura 13C y 13E). Las caseínas también aumentaron el porcentaje de células monocíticas pero en menor proporción que el CasNa (figura 14), por ejemplo, en los cultivos con κ -caseína aumentó de 4% a 12, 13 y 15% con 0.5, 1 y 2 mg/mL respectivamente pero fue significativa sólo con las dosis más altas. En la tinción para granulocitos (figura 13D y 13F), en el cultivo control se encontró un 50% de células positivas, este porcentaje disminuyó con el CasNa y las caseínas, sin embargo, nunca fue menor al 30%. Asimismo, la 1-5 y la 1-7 β -casomorfina no alteraron los porcentajes de células para los dos linajes (figura 14).

En la línea celular WEHI-3, las células positivas con cualquier tratamiento en la tinción para monocitos se mantuvo siempre alrededor del 5%, y las células positivas para la tinción de granulocitos fue entre el 65 y 75%, destacando que en ninguna de las condiciones la diferencia fue significativa. Por lo tanto, estos resultados indican que no hay cambios en la población de monocitos o de granulocitos en presencia de CasNa, α -, β - y κ -caseína y 1-7 β -casomorfina en las células WEHI-3 (figura 15).

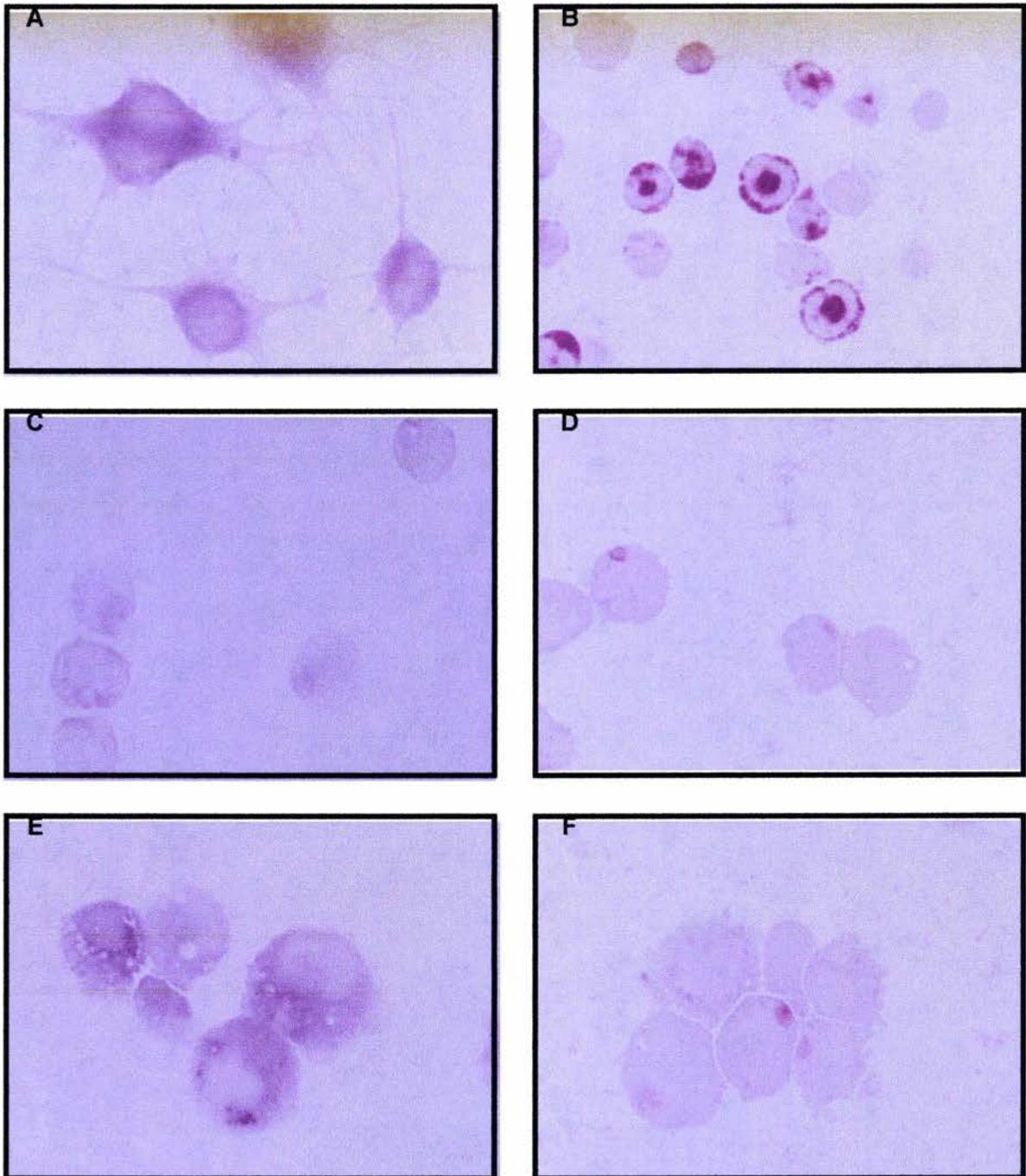


Figura 13. Tinciones citoquímicas (400X). Linaje monocito macrófago, tinción α -naftil acetato esterasa; A) línea monocítica P-388, C) células 32D con vehículo, E) células 32D en presencia de 1mg/mL de CasNa. Linaje granulocito-neutrófilo, tinción cloroacetato esterasa; B) células de médula ósea, D) células 32D con vehículo, F) células 32D en presencia de 1mg/mL de CasNa.

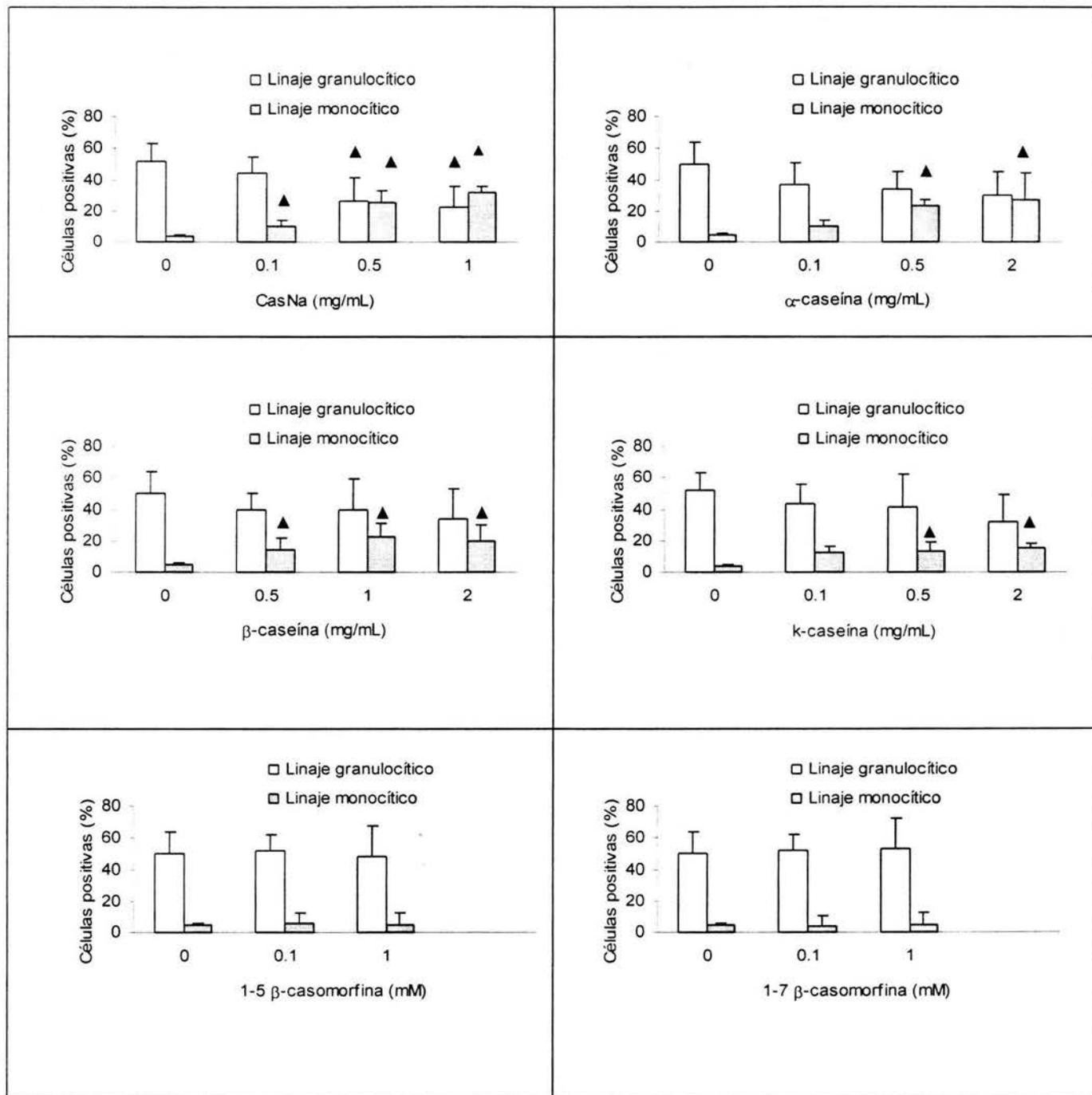


Figura 14. Diferenciación de la línea celular 32D en presencia de CasNa, caseínas y casomorfinas (Citoquímica). Las células 32D fueron cultivadas por 72 horas con CasNa, caseínas (mg/mL) y casomorfinas (mM), el tipo celular fue determinado después de realizar tinciones citoquímicas específicas para el linaje granulocítico (cloroacetato esterasa) y para el linaje monocítico (α -naftilacetato esterasa). Se grafica promedio y desviación estándar (D.S) (▲ P<0.05) con respecto a 0 mg/mL.

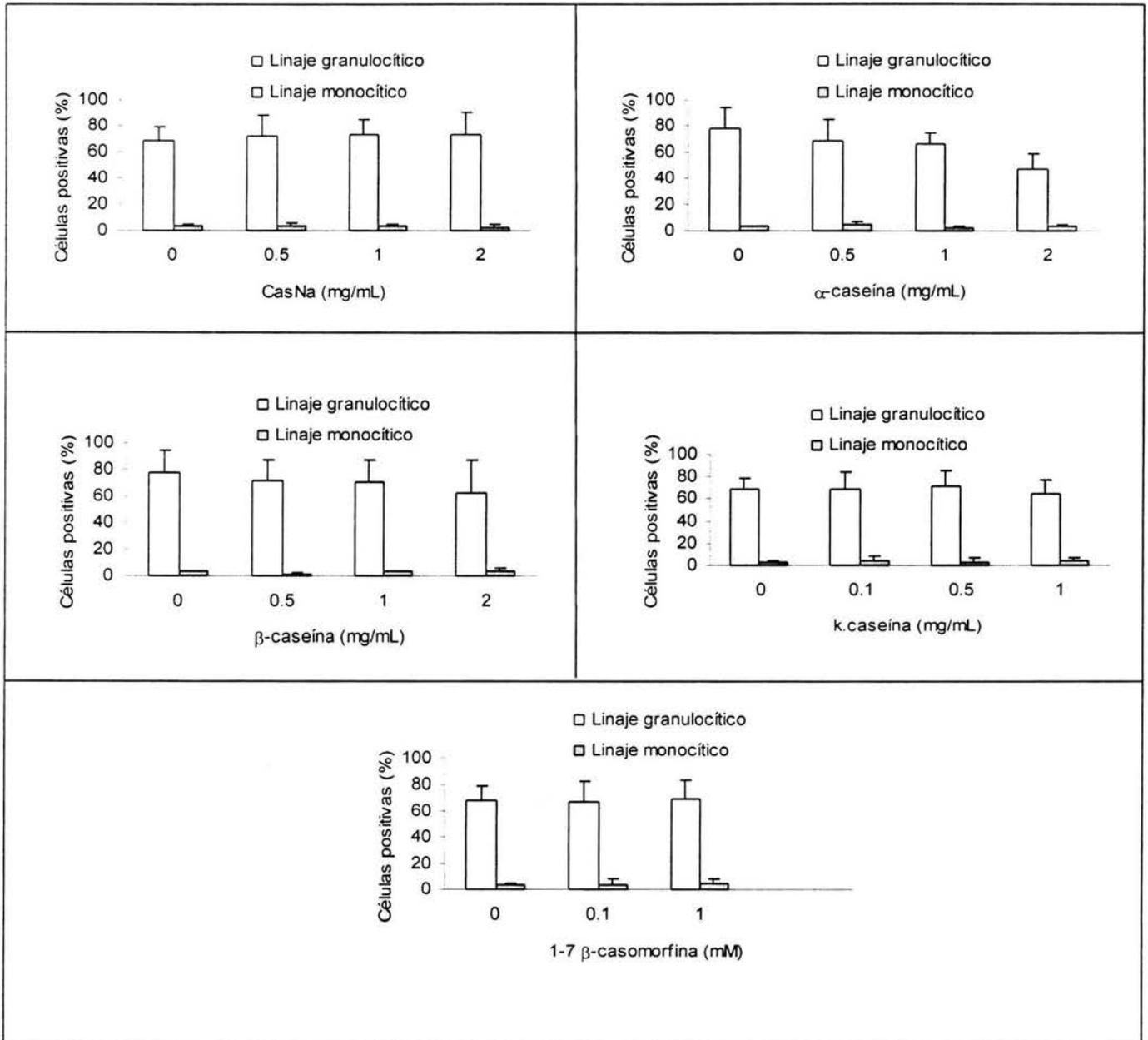


Figura 15. Diferenciación de la línea celular WEHI-3 en presencia de CasNa, caseínas y casomorfina (Citoquímica). Las células WEHI-3 fueron cultivadas por 72 horas con varias dosis de CasNa, , caseínas (mg/mL) y 1-7 β -casomorfina (mM), el tipo celular fue determinado después de realizar tinciones citoquímicas específicas para el linaje granulocítico (cloroacetato esterasa) y para el linaje monocítico (α -naftilacetato esterasa). Se grafica promedio y D.S. (▲ P<0.05) con respecto a 0 mg/mL

C) Antígenos de superficie

Además de las evaluaciones morfológicas y citoquímicas, se determinó la aparición o el incremento de antígenos específicos del linaje monocito-macrófago y del linaje granulocito-neutrófilo mediante citometría de flujo. Se empleó el anticuerpo anti-Fms que reconoce un dominio extracelular del receptor del M-CSF (M-CSFR o *c-fms*), presente en células del linaje macrófagico (Byrne, 1981), y el anticuerpo Gr-1, el cual reconoce a un dominio de Ly-6G, que es una proteína de membrana de 21-25 kDa acoplada a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Aunque a Ly-6G no se la ha asignado CD (cluster of differentiation) su expresión está directamente correlacionada con la diferenciación granulocítica (Tepper, 1992; Metcalf, 1997).

Como primer paso los anticuerpos fueron probados, empleando la línea celular macrófagica de ratón P-388 para el anticuerpo anti-Fms y células en banda de médula ósea de ratones CD-1 separadas por Ficoll para el anticuerpo Gr-1, y para determinar la especificidad de los anticuerpos, además, de usarse un control de isotipo, se emplearon controles negativos, células en banda para el anticuerpo anti-Fms, y la línea fibroblástica L-929 para el anticuerpo Gr-1. Se evaluó la fluorescencia de las células sin anticuerpo (fluorescencia propia), con el isotipo y en presencia de cada anticuerpo específico (figura 16). En las células P-388 y de las células en banda, se observa un notable incremento en la fluorescencia en las células con los anticuerpos específicos y sus controles de isotipo, y respecto a los controles negativos. Para tener una mejor idea de las magnitudes del desplazamiento de la gráfica que indica incremento en la expresión del antígeno, se calculó un índice de fluorescencia (IF) dividiendo la intensidad de fluorescencia de las células con el isotipo con la fluorescencia de las células con su anticuerpo, por lo que un IF igual a 1 indica que los valores son iguales, un IF de 2 indica que la fluorescencia de las células con el anticuerpo es el doble a las células con solo isotipo. La fluorescencia de las P-388 (tabla 7A) con el isotipo es de 28.48 y de 145.82 en presencia del anticuerpo anti-Fms (IF de 5.12). En las células en banda (tabla 7B) los valores de fluorescencia es de 4.14 con el isotipo y de 371.23 con el anticuerpo Gr-1 (IF de 89.67). Con estos ensayos se comprobó la especificidad de los anticuerpos.

Además se determinaron los niveles basales de ambos antígenos en las células 32D y en las células WEHI-3 (figura 16, tabla 7A y B). Resaltando, que en las células 32D la presencia de ambos antígenos es menor que en las células WEHI-3, lo cual corresponde con el estadio de diferenciación reportado para ambas líneas celulares.

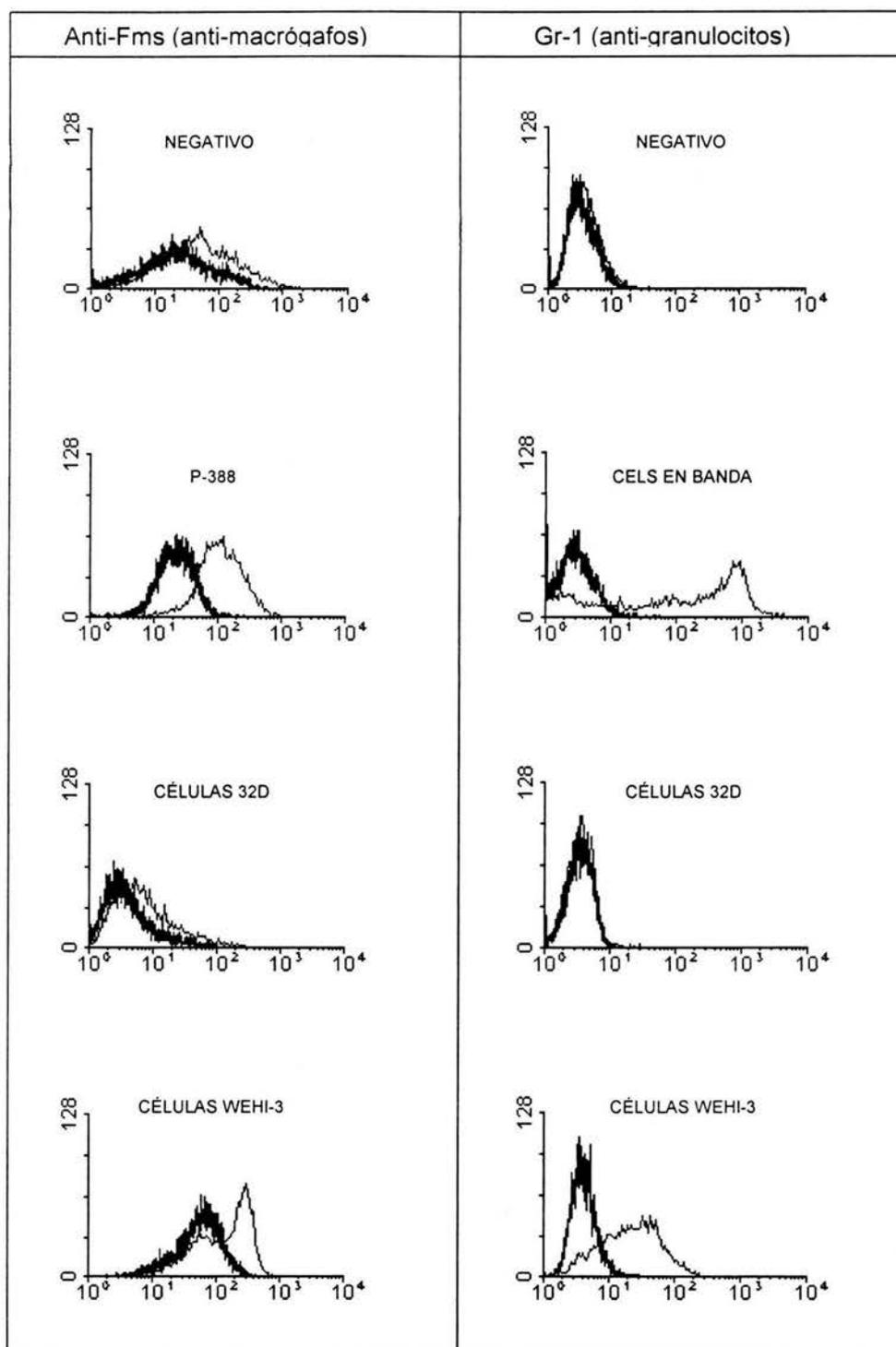


Figura 16. Análisis de diferenciación por citometría de flujo (controles). Para determinar la especificidad de los anticuerpos se emplearon células de ratón. Para el anticuerpo anti-Fms, células en banda de médula ósea como control negativo, y la línea celular monocítica P-388 como control positivo. Para el anticuerpo Gr-1, se empleó la línea celular fibroblástica L-929 como control negativo, y células en banda de médula ósea como control positivo. Además, se determinaron los niveles basales de las células 32D y WEHI-3. En todos los casos se evaluaron células en presencia del anticuerpo específico (línea delgada) y con el isotipo respectivo (línea negrita). Los histogramas corresponden a una determinación representativa. Eje horizontal = intensidad de fluorescencia, eje vertical = número de eventos.

A

	Isotipo	Anticuerpo (anti Fms)	Índice de fluorescencia (IF)
Células en banda de médula ósea (negativo)	47.83	109.33	2.28
Línea celular monocítica P-388 (positivo)	28.48	145.82	5.12
Línea celular 32D	25.48	42.68	1.67
Línea celular WEHI-3	30.71	93.88	3.05

B

	Isotipo	Anticuerpo (Gr-1)	Índice de fluorescencia
Línea celular fibroblástica L-929 (negativo)	4.13	4.31	1.04
Células en banda de médula ósea (positivo)	4.14	371.23	89.67
Línea celular 32D	11.87	10.87	0.916
Línea celular WEHI-3	7.25	39.21	5.41

Tabla 7. Análisis de diferenciación por citometría de flujo (Índices de fluorescencia). Células en presencia A) del anticuerpo anti-Fms y B) del anticuerpo Gr-1, y sus respectivos controles de isotipo. El Índice de fluorescencia (IF) fue calculado dividiendo la fluorescencia de células con el anticuerpo específico entre la fluorescencia de células con el isotipo. Para el caso de las células 32D y WEHI-3 se anota el promedio de 4 repeticiones.

Se realizaron las evaluaciones de las células 32D en presencia de los compuestos empleando el anticuerpo anti-Fms. En los histogramas se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia de los cultivos tratados con CasNa y caseínas al compararlos con el cultivo de solo vehículo; este desplazamiento es más evidente con CasNa, y se observa en menor proporción con κ -caseína y las casomorfinas (figura 17). También se calculó un IF dividiendo la intensidad de fluorescencia de las células tratadas entre la intensidad de fluorescencia de las células cultivadas con solo vehículo, y se presenta el promedio de 3 ensayos independientes (tabla 8). El IF para el anticuerpo Anti-Fms es de 2.63, 2.12, 2.09 y 1.31 para CasNa, α -, β - y κ -caseína respectivamente, y para las casomorfinas los valores del IF fueron de 1.24, 1.31 y 1.23 para 1-5 β -casomorfina, 1-7 β -casomorfina y 90-95 α -casomorfina respectivamente (figura 18). Cuando se empleó el anticuerpo Gr-1 en las células 32D tratadas también hay un aumento en la fluorescencia (figura 18) pero éste es menor al visto con el anticuerpo anti-Fms, los IF s en CasNa y caseínas son cercanos a 1.5, mientras que con las 3 casomorfinas son menores o iguales a 1 (tabla 8). Estos resultados nos indican que existe un aumento en la diferenciación de las células 32D cuando son cultivadas en presencia de CasNa y de las caseínas y esta diferenciación es principalmente hacia el linaje monocito-macrófago, datos que apoyan a lo evaluado por morfología y de las tinciones citoquímicas.

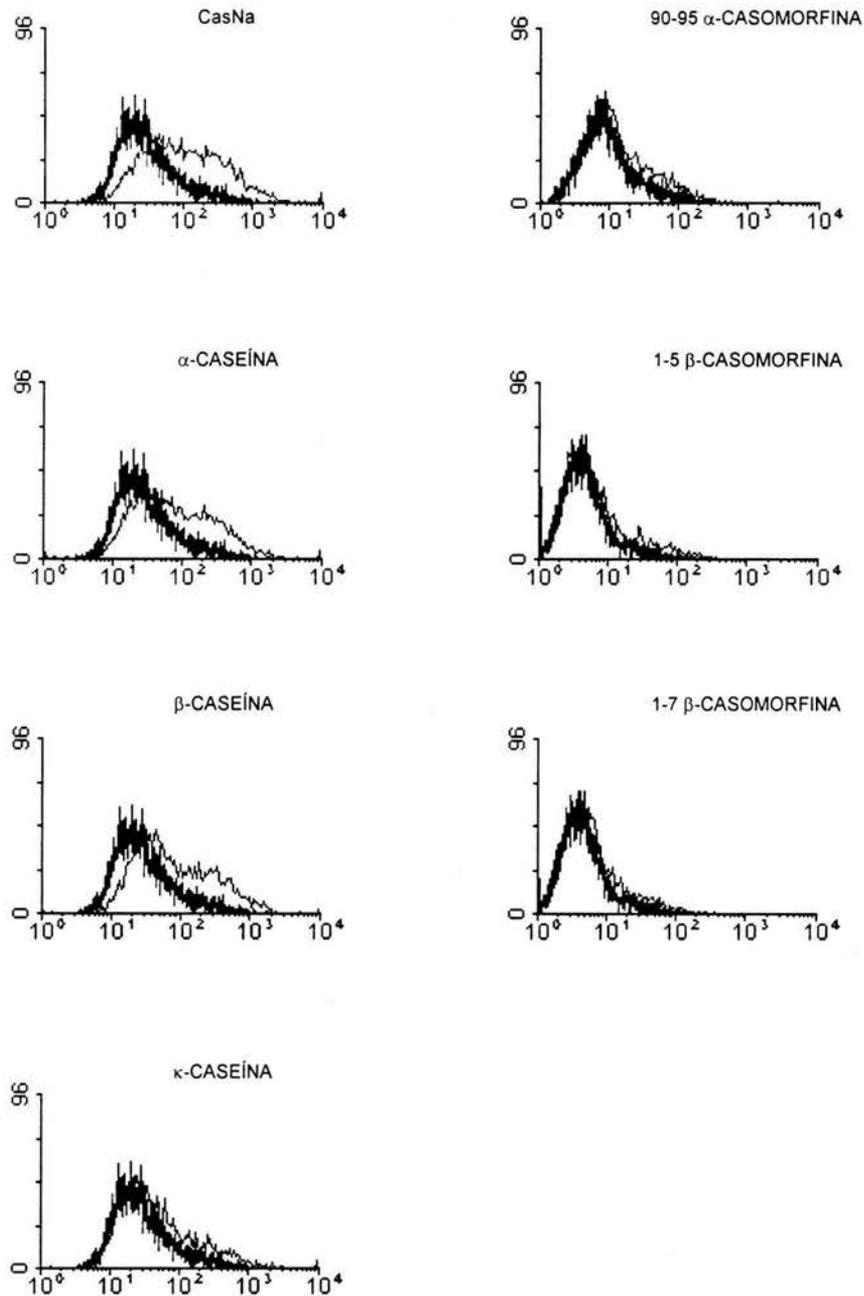


Figura 17. Determinación de diferenciación por citometría de flujo de las células 32D. Las células 32D fueron cultivadas por 72 horas con PBS (líneas negrita) o con 0.5 mg/m de CasNa, 1 mg/mL de caseínas o 1mM de casomorfinas (líneas delgadas) y se utilizó el anticuerpo anti-Fms para evaluar la diferenciación monocítica. Se presenta el histograma de un ensayo representativo. Eje horizontal = intensidad de fluorescencia, eje vertical = número de eventos.

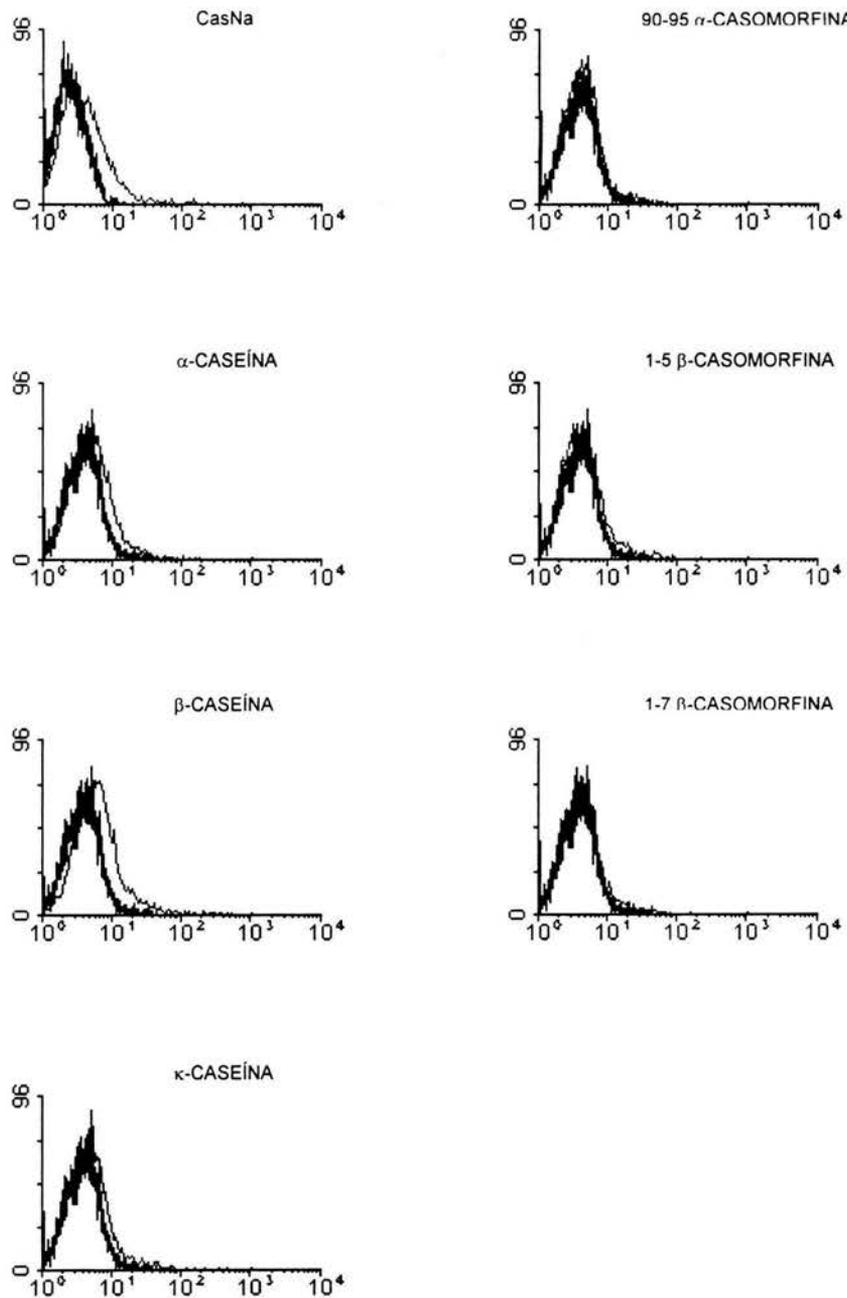


Figura 18. Determinación de diferenciación por citometría de flujo de las células 32D. Las células 32D fueron cultivadas por 72 horas con PBS (líneas negrita) o con 0.5 mg/m de CasNa, 1 mg/mL de caseínas o 1mM de casomorfinas (líneas delgadas) y se utilizó el anticuerpo Gr-1 para evaluar la diferenciación granulocítica. Se presenta el histograma de un ensayo representativo. Eje horizontal = intensidad de fluorescencia, eje vertical = número de eventos.

Tratamiento	Anticuerpo (anti-Fms)	Anticuerpo (Gr-1)
CasNa	2.63	1.34
α -caseína	2.12	1.61
β -caseína	2.09	1.85
κ -caseína	1.31	1.50
90-95 α -casomorfina	1.24	0.89
1-5 β -casomorfina	1.31	1.09
1-7 β -casomorfina	1.23	1.05

Tabla 8. Índices de fluorescencias (fluorescencia tratamiento / fluorescencia control) en células 32D en presencia de CasNa, caseínas y casomorfina; evaluados con el anticuerpo para macrófagos (anti-Fms) y con el anticuerpo para granulocitos (Gr-1).

Para el caso de las células WEHI-3 tratadas con CasNa, las caseínas y las casomorfinas el desplazamiento en los espectros de fluorescencia del anticuerpo anti-Fms es ligera (figura 19) y los valores del IF son de 1.21 hacia a bajo, y para las casomorfinas muy cercanos a 1.00 (tabla 9). Para el caso del anticuerpo Gr-1, los resultados son muy similares a los del anticuerpo anti-Fms (figura 20), y los valores de los índices están por debajo de 1.34 y muy cercano a 1.00 en las casomorfinas (tabla 9). Por lo tanto, estos resultados y apoyándonos en las tinciones realizadas, nos indican que no existe un aumento evidente en la diferenciación de las células WEHI-3 en presencia de CasNa, caseínas o casomorfinas.

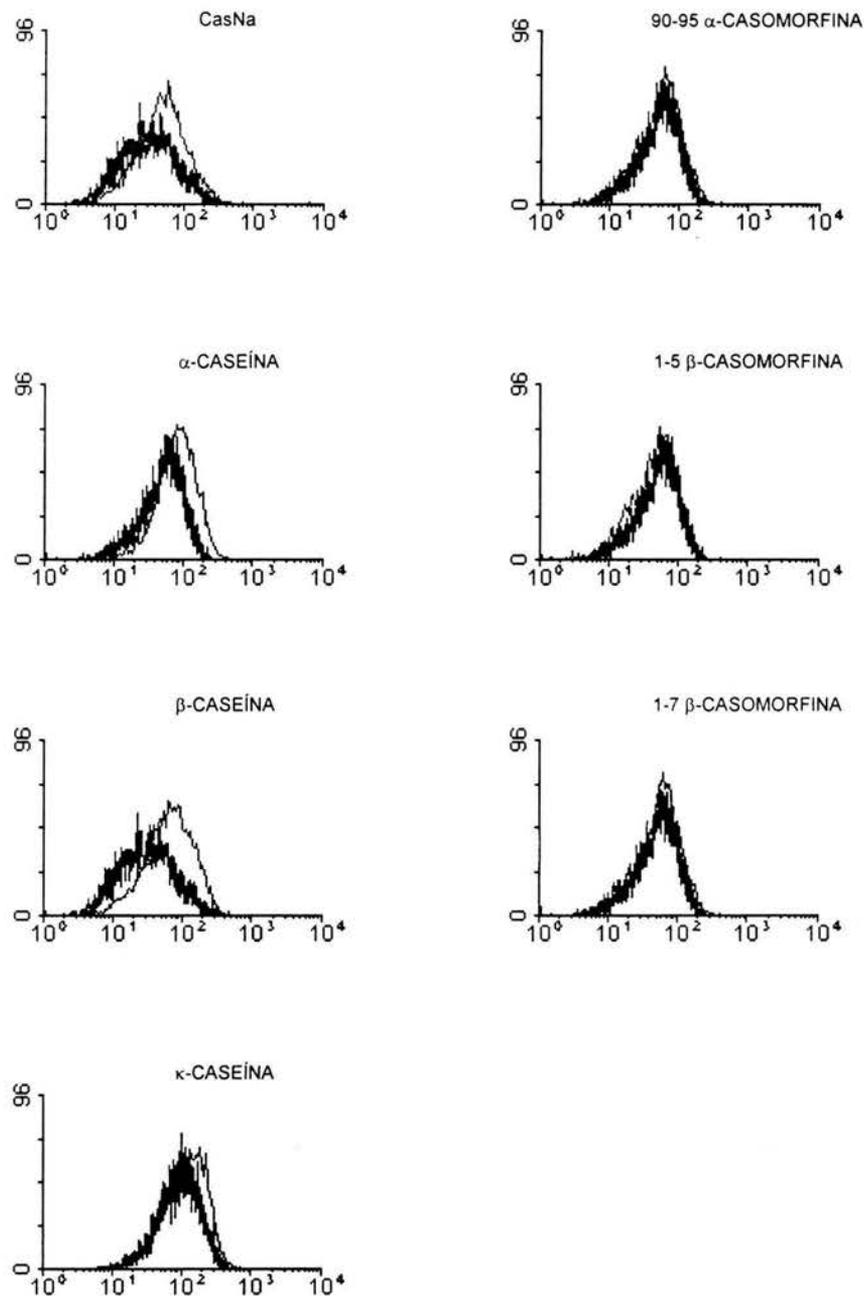


Figura 19. Determinación de diferenciación por citometría de flujo de las células WEHI-3. Las células WEHI-3 fueron cultivadas por 72 horas con PBS (líneas negra) o con 0.5 mg/m de CasNa o 1 mg/mL de α -, β - y κ -caseína (líneas delgadas) y se utilizó el anticuerpo anti-Fms para evaluar la diferenciación monocítica. Se presenta el histograma de un ensayo representativo. Eje horizontal = intensidad de fluorescencia, eje vertical = número de eventos.

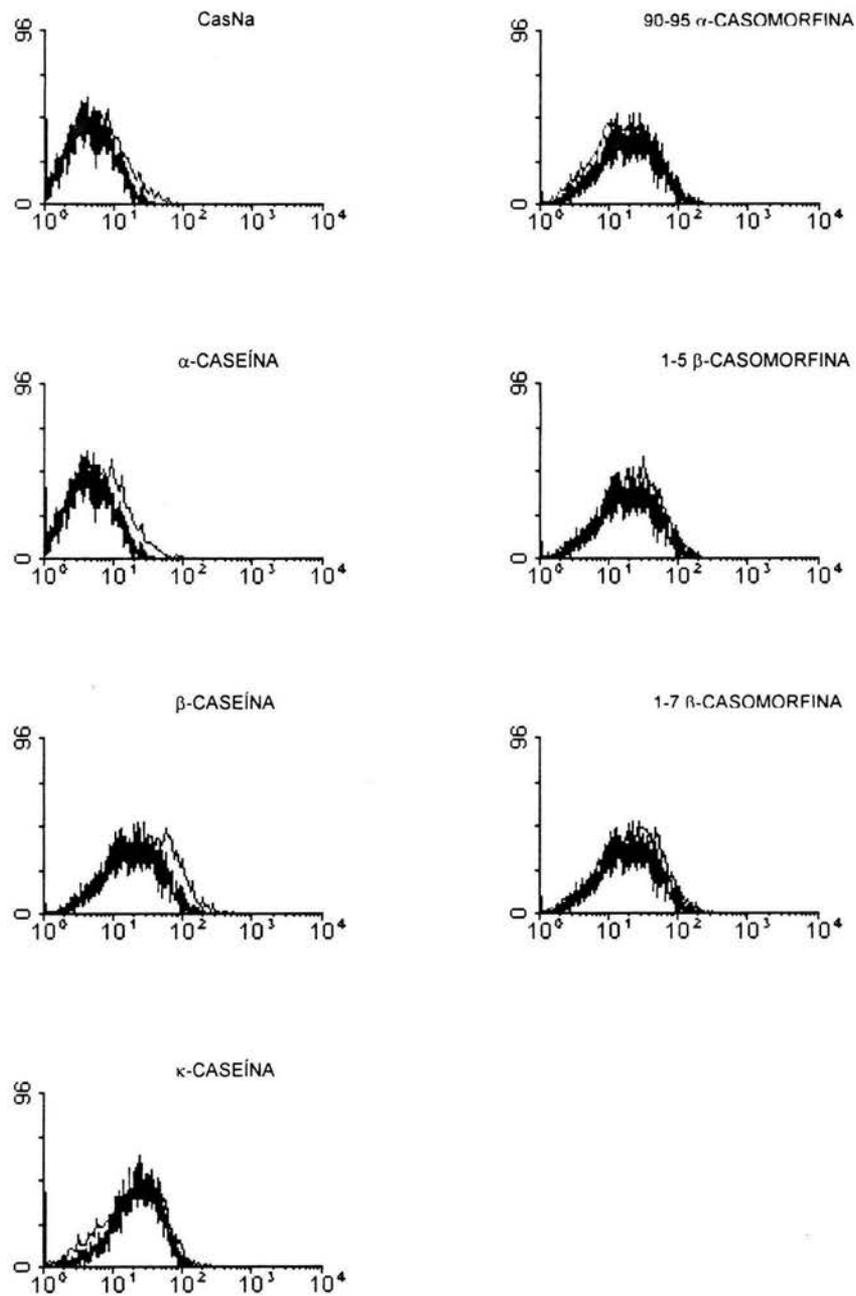


Figura 20. Determinación de diferenciación por citometría de flujo de las células WEHI-3. Las células WEHI-3 fueron cultivadas por 72 horas con PBS (líneas negra) o con 0.5 mg/m de CasNa o 1 mg/mL de α -, β - y κ -caseína (líneas delgadas) y se utilizó el anticuerpo GR-1 para evaluar la diferenciación granulocítica. Se presenta el histograma de un ensayo representativo. Eje horizontal = intensidad de fluorescencia, eje vertical = número de eventos.

Tratamiento	Anticuerpo (anti-Fms)	Anticuerpo (Gr-1)
CasNa	1.21	1.20
α -caseína	1.47	1.34
β -caseína	1.48	1.21
κ -caseína	1.45	1.23
90-95 α -casomorfina	1.04	0.98
1-5 β -casomorfina	1.02	1.08
1-7 β -casomorfina	1.14	0.83

Tabla 9. Índices de fluorescencias (fluorescencia tratamiento / fluorescencia control) en células WEHI-3 en presencia de CasNa, caseínas y casomorfina; evaluados con el anticuerpo para macrófagos (anti-Fms) y con el anticuerpo para granulocitos (Gr-1).

OBJETIVO 2. DETERMINAR SI EL EFECTO DE LOS DERIVADOS DE LA CASEÍNA Y CASOMORFINAS EN LAS CÉLULAS EN ESTUDIO ES MEDIADO POR RECEPTORES OPIOIDES

Efecto de Naloxone (NLX) en la proliferación de las células 32D y WEHI-3

Un ensayo para determinar si un compuesto actúa vía receptores opioides es revirtiendo su efecto con un antagonista. El Naloxone (NLX) es un antagonista usado ampliamente para este tipo de ensayos. Por estas razones el primer paso fue evaluar el efecto del NLX en la proliferación de las líneas celulares. Se realizó un ensayo con un espectro de dosis amplio, desde 0.01 μM hasta 1000 μM , en ambas líneas celulares.

En las células 32D se observó que con 1000 μM la proliferación es casi nula (2%) mientras que con 10 y 100 μM la proliferación es de 73 y 79% respectivamente (figura 21A), por lo anterior, se realizó otro ensayo con dosis de 16 a 500 μM . Con estas concentraciones de NLX la proliferación es reducida de forma dosis-respuesta; destacando que, con la dosis de 62.5 μM la proliferación es afectada muy ligeramente (90%) y con las dosis de 16 y 31 μM ya no se afectan (113 y 97%) (figura 21B). Como el objetivo de usar NLX es revertir la reducción de la proliferación de CasNa, caseínas y casomorfina, se tomó la dosis máxima que no alteró la proliferación (31 μM) y la dosis que la afectó ligeramente (62.5 μM). Las células WEHI-3 se trabajaron de una manera similar a las células 32D. Se realizó un ensayo dosis-respuesta y se observó que el efecto de NLX es similar al determinado con 32D (figura 22A y B). Por lo tanto, se utilizaron las dosis de 31 y 62.5 μM para los ensayos de regresión en ambas líneas celulares.

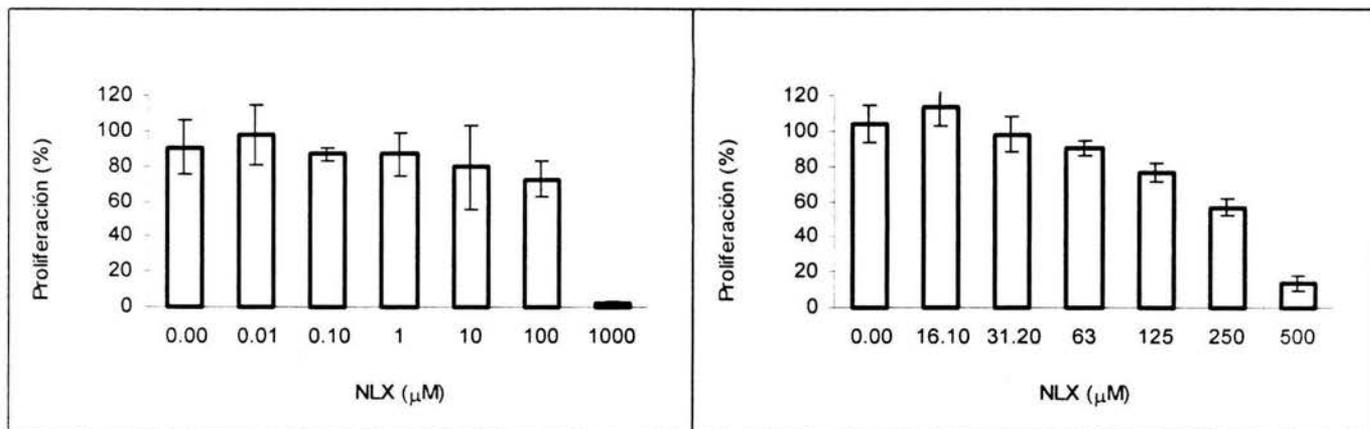


Figura 21. Efecto de Naloxone en la proliferación de las células 32D. Se realizaron ensayos dosis-respuesta de NLX en las células 32D y se determinó la proliferación por conteo directo (A) e incorporación de 3H-timidina (B). Se grafica el promedio del porcentaje de proliferación con respecto al cultivo control y su D.S.

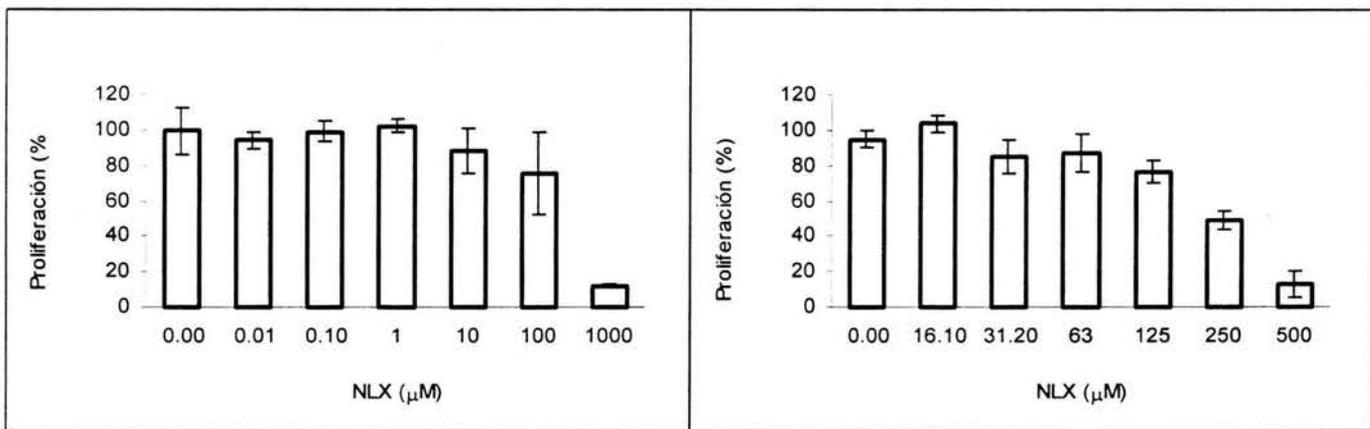


Figura 22. Efecto de Naloxone en la proliferación de las células WEHI-3. Se realizaron ensayos dosis-respuesta de NLX en las células WEHI-3 y se determinó la proliferación por Cristal violeta (A) e incorporación de 3H-timidina. Se grafica el promedio del porcentaje de proliferación con respecto al cultivo control y su D.S.

Ensayos de regresión del efecto de CasNa, caseínas y casomorfinas en las células 32D y WEHI-3

Con las concentraciones de NLX usadas para los ensayos de regresión en las células 32D la proliferación se vio ligeramente afectada (89% para 31 μ M y 88% para 62.5 μ M) y esta disminución fue significativa sólo con 62.5 μ M (figura 23). En el caso de WEHI-3 las dosis de NLX empleadas disminuyeron ligeramente la proliferación (87 y 84%) pero no fue significativa (figura 24).

Se ha reportado que las casomorfinas son agonistas de receptores opioides, una forma de confirmar este tipo de actividad es la adición de NLX, un reconocido antagonista opioide (Teschmacher, 1997). En el presente proyecto, de las casomorfinas usadas, la 1-5 β -casomorfina presentó el mayor efecto en las células 32D con una reducción casi del 50% de la proliferación. Por lo tanto, se eligió esta última para realizar los primeros ensayos de regresión. Como se esperaba, la proliferación de las células 32D en presencia de 1-5 β -casomorfina fue del 59% con respecto al control, pero la proliferación aumenta significativamente a 76 y 72% cuando además de la casomorfina se adiciona NLX 31 y 62.5 μ M respectivamente (figura 25). Estos datos muestran que la reducción de la proliferación por las 1-5 β -casomorfina es mediado en parte por receptores opioides en las células 32D.

Posteriormente, se determinó si el CasNa y las caseínas actuaban vía receptores opioides, se emplearon dosis que afectaron claramente la proliferación pero donde la viabilidad fue mayor al 90%; 0.1 y 0.5 mg/mL de CasNa y 0.5 y 1 mg/mL de las caseínas para las células 32D, 1 y 2 mg/mL de CasNa, α - y β -caseína y 0.5 y 1 mg/mL de κ -caseína para las células WEHI-3.

Al cultivar las células 32D con NLX y CasNa, no se recupera la proliferación y por el contrario, existe una disminución al compararla con los cultivos en presencia de solo CasNa, por ejemplo para 0.5 mg/mL de CasNa la proliferación es de 53% misma que se ve reducida a 48 y 40% en los cultivos con 31 y 62.5 μ M de NLX (figura 25), esta ligera disminución se debe muy posiblemente al efecto de NLX (figura 23). En β -caseína también existe diferencia significativa entre los cultivos en ausencia y presencia de NLX pero al igual que con CasNa ésta es hacia una disminución. En α - y κ -caseína no hay diferencias significativas en los cultivos de 32D con o sin NLX (figura 25). Por lo anterior, los resultados indican que ninguna

de las dosis empleadas de NLX revierte el efecto de CasNa o de las caseínas en las células 32D y por lo tanto, estos compuestos no actúan mediante receptores opioides.

En las células WEHI-3, ninguna de las dosis de NLX revirtió el efecto en la proliferación de CasNa y de las caseínas, y al igual que en 32D hay una ligera disminución (adicional) en la proliferación cuando se adiciona NLX (figura 26).

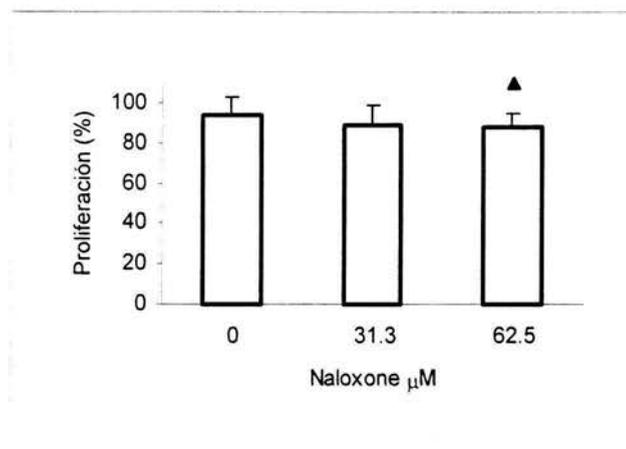


Figura 23. Efecto en las células 32D de las dosis de Naloxone empleadas para los ensayos de regresión. Diferencia significativa (▲ $P < 0.05$ y ■ $P < 0.01$) con respecto a 0 μM . Se expresa la media y su D.S.

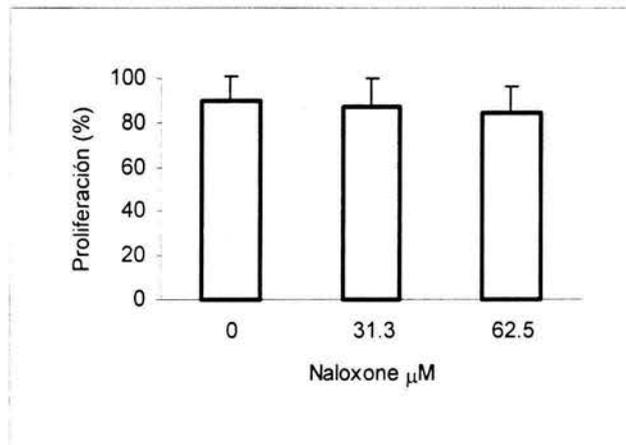


Figura 24. Efecto en las células WEHI-3 de las dosis de Naloxone empleadas para los ensayos de regresión. La proliferación fue evaluada por incorporación de 3H-timidina. Diferencia significativa (▲ $P < 0.05$ y ■ $P < 0.01$) con respecto a 0 μM . Se expresa la media y su D.S.

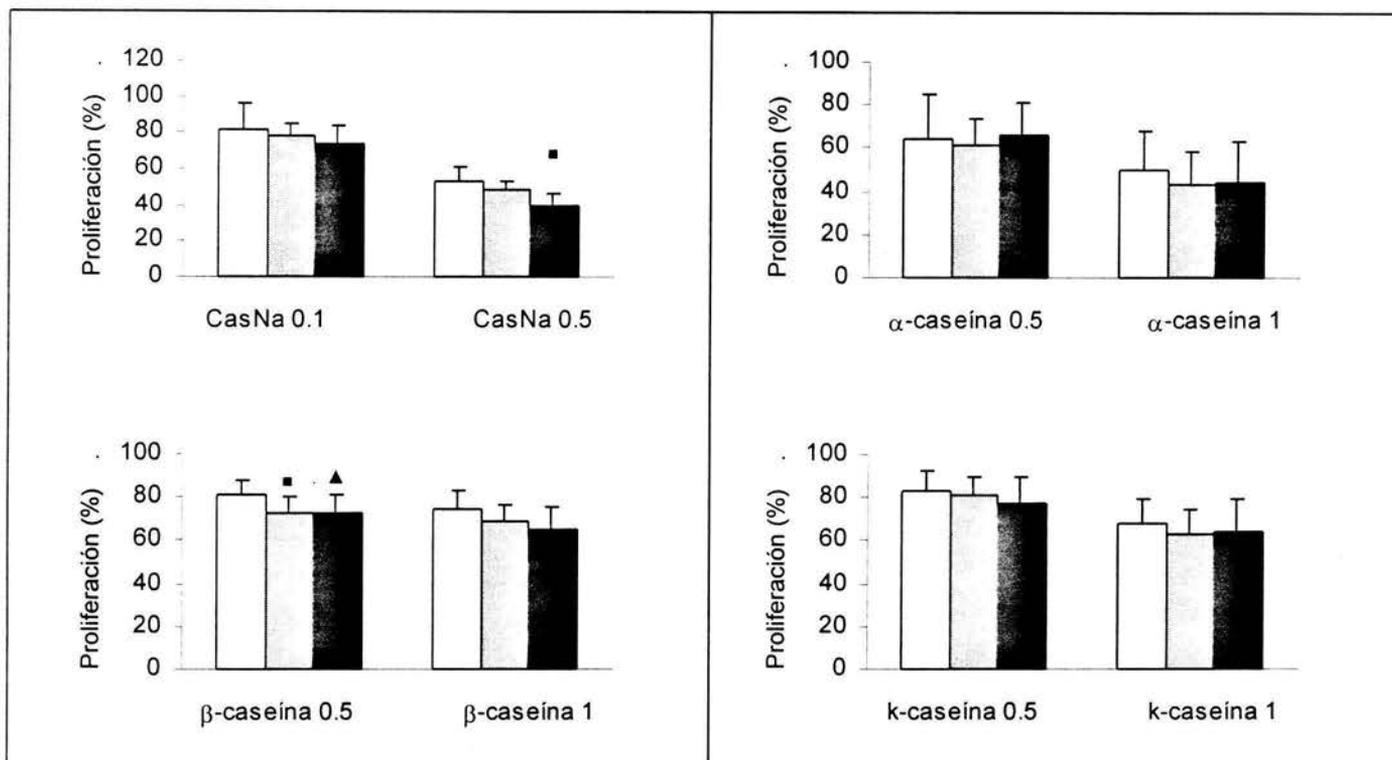
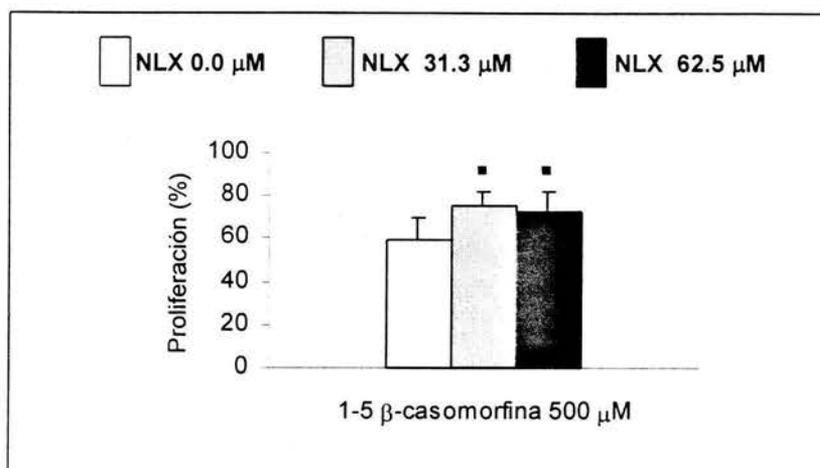


Figura 25. Regresión del efecto de CasNa, caseínas y casomorfina por el antagonista opiode Naloxone en las células 32D. Las células 32D fueron cultivadas con Naloxone y se adiciono CasNa, α-, β-, κ-caseína (mg/mL) o 1-5 β-casomorfina (μM); la proliferación fue evaluada por incorporación de 3H-timidina. Diferencia significativa (▲P< 0.05 y ■ P< 0.01) con respecto a cultivo sin Naloxone (NLX 0.0). Se expresa la media y su D.S.

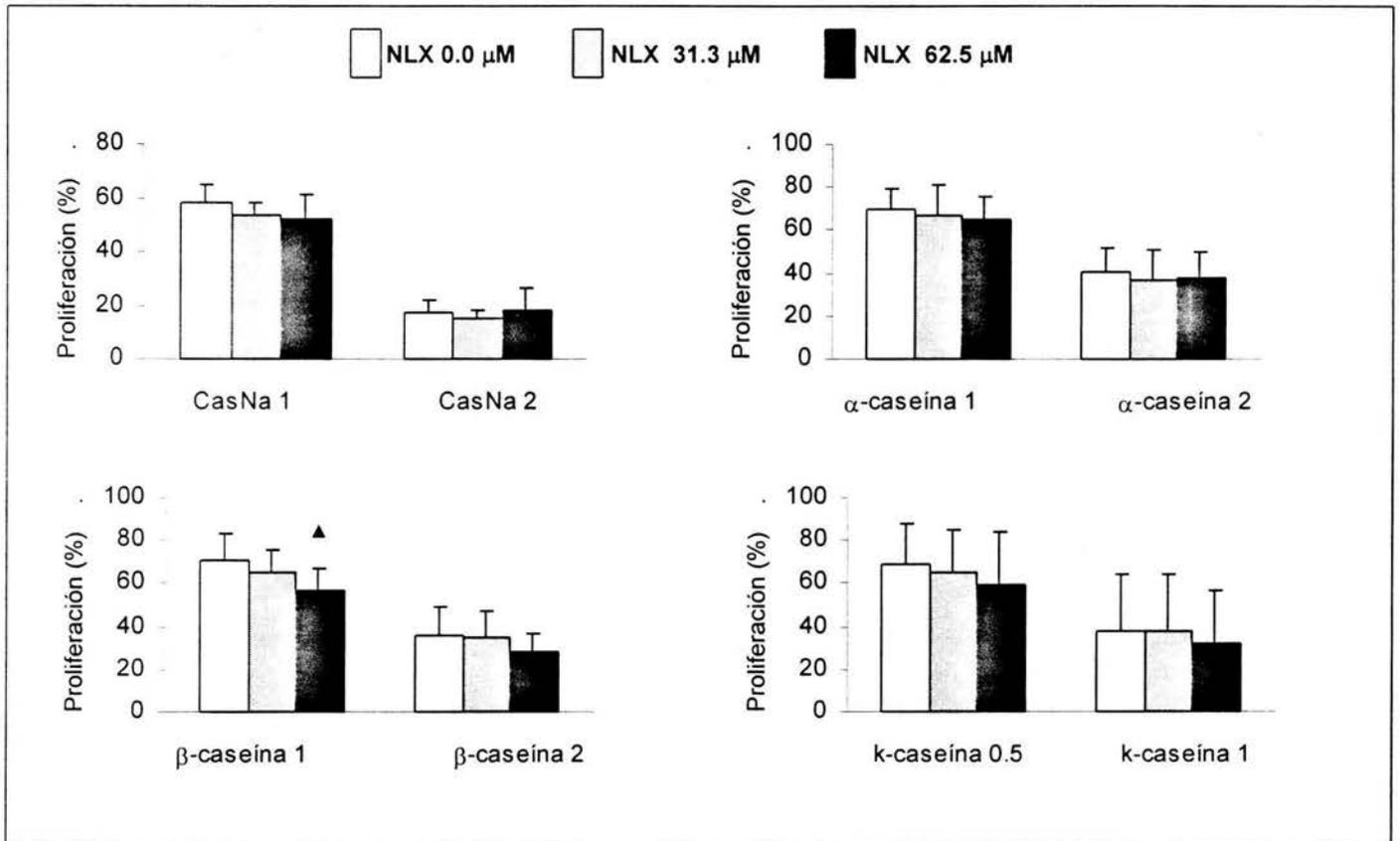


Figura 26. Regresión del efecto de CasNa y caseínas por el antagonista opioide Naloxone en las células WEHI 3. Las células WEHI 3 fueron cultivadas con Naloxone y se adiciono CasNa, α-, β-, κ-caseína (mg/mL) ; la proliferación fue evaluada por incorporación de 3H-timidina. Diferencia significativa (▲P< 0.05 y ■ P< 0.01) con respecto a cultivo sin Naloxone (NLX 0.0). Se expresa la media y su D.S.

OBJETIVO 3. EVALUAR LA POSIBLE INTERVENCIÓN DE ALGÚN FACTOR DE CRECIMIENTO HEMATOPOYÉTICO (FCH) EN LOS EFECTOS OBSERVADOS, EN LAS CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS UTILIZADAS

En las dos líneas empleadas existe reducción en la proliferación, pero ésta es más evidente en la línea 32D, en la que también existe diferenciación. Asimismo, en las células 32D, el CasNa presentó el mayor efecto, tanto en la reducción de la proliferación como en la inducción de diferenciación. Por lo anterior para determinar la posible presencia y/o intervención de algún factor de crecimiento hematopoyético (FCH) se trabajó con las células 32D y se eligió al CasNa.

Actividad estimuladora de colonias tipo M-CSF en el sobrenadante de las células 32D en presencia de CasNa

Las células 32D se cultivaron con 2 mg/mL de CasNa a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas), se evaluó la proliferación y el medio condicionado (MC) fue colectado para determinar la presencia de algún FCH. Como en los resultados previos, las células 32D expuestas a 2 mg/mL de CasNa muestran reducción en su proliferación y ésta es significativa a las 72 y 96 horas en comparación con las células sin tratamiento (figura 27A).

Para evaluar si el MC de las células cultivadas con o sin CasNa tiene actividad estimuladora de colonias (presencia de algún FCH), los MC s colectados fueron usados como inductores de la generación de colonias empleando cultivos en agar y células de médula ósea. En los resultados se observa que el MC de las células 32D tratadas con CasNa durante 72 y 96 horas generan en promedio 97 y 108 colonias contra 3 y 0 colonias generadas con el MC de los cultivos con solo vehículo (figura 27B). Por lo tanto, concluimos que los cultivos de las células 32D con CasNa presentan una fuerte actividad estimuladora de colonias. Al realizar tinciones morfológicas y citoquímicas, se observó que cerca del 90% están integradas por células del linaje monocito-macrófago (figura 28).

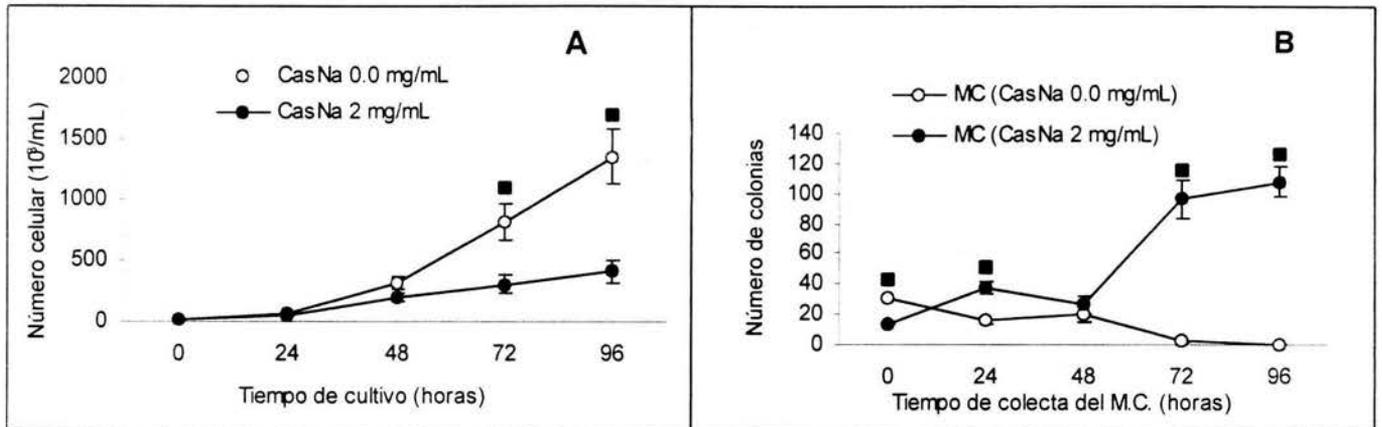


Figura 27. Actividad formadora de colonias del medio condicionada (MC) de las células 32D en presencia de CasNa. Se realizó una cinética de proliferación (0, 24, 48, 72 y 96 horas) de las células 32D en presencia o ausencia de CasNa (2 mg/ml), y a cada tiempo se evaluó la proliferación por conteo directo (A). Además se colectaron los medios condicionados y se evaluó su actividad formadora de colonias en cultivos de médula ósea en agar (B). Diferencia significativa ($\blacktriangle P < 0.05$ y $\blacksquare P < 0.01$) entre CasNa 0.0 vs CasNa 2 mg/mL para cada tiempo.

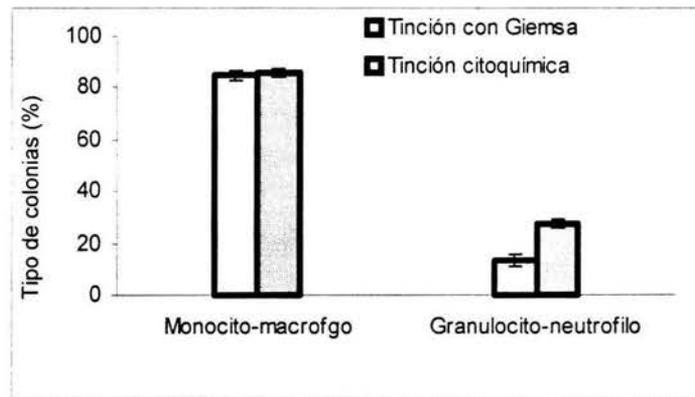


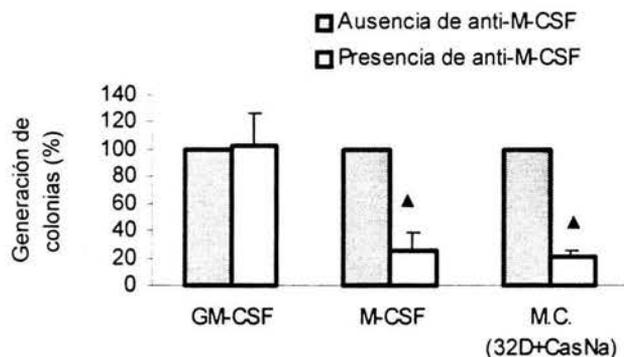
Figura 28. Tipo de colonias generadas con los MC's de las células 32D en presencia de CasNa. Las colonias obtenidas en las ensayos de agar fueron teñidas con Giemsa y se determinó su morfología; además se realizaron tinciones citoquímicas para el linaje monocito-macrófago (α -naftil acetato esterasa) y para el linaje granulocito-neutrófilo (cloro-acetato esterasa). Se grafican promedios y su D.S.

Presencia de M-CSF en las células 32D cultivadas con CasNa

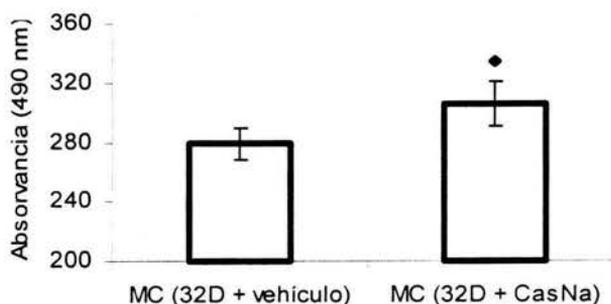
Considerando que el principal regulador para supervivencia, proliferación y diferenciación de macrófagos y sus precursores es el Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) (Barreda et al, 2004), y que el MC de las células 32D tratadas con CasNa induce principalmente la formación de colonias del linaje monocito-macrófago, se procedió a evaluar si tal actividad era responsabilidad del M-CSF. Se empleó el anticuerpo anti rmM-CSF (anti-M-CSF) en los ensayos de colonias, además, se utilizó M-CSF y GM-CSF en presencia y ausencia de anti-M-CSF como control positivo y negativo de la inhibición.

La adición de anti-M-CSF inhibió en un 75% las colonias inducidas por el rmM-CSF, pero no inhibió las colonias generadas por el rmGM-CSF (figura 29). Cuando el anti-M-CSF fue adicionado a los ensayos de colonias del MC de las células 32D en presencia de CasNa se inhibió en un 80% la formación de colonias. Esto se traduce a que el principal responsable de la generación de colonias por el MC es M-CSF.

Para confirmar la presencia de M-CSF, se realizó un ensayo de ELISA. En los resultados se observó un aumento significativo en la absorbancia del MC de 32D+CasNa al compararlo con el MC de 32D+vehículo (figura 30).



Gráfica 22. Inhibición de actividad formadora de colonias del MC de 32D en presencia de CasNa por el anticuerpo anti-M-CSF. A los ensayos de agar se adicionó el anticuerpo anti-M-CSF y se empleó M-CSF como control positivo y GM-CSF como control de negativo de inhibición. Diferencia significativa (▲ $P < 0.05$ y ■ $P < 0.01$) comparando los cultivos en presencia y ausencia de anticuerpo.



Gráfica 23. Identificación de M-CSF en el MC de las células 32D cultivadas en presencia de CasNa. Se determinó por ensayos de ELISA la presencia de M-CSF en los MC's de las células 32D cultivadas en presencia y ausencia de CasNa. Diferencia significativa (◆ $P < 0.05$ y ■ $P < 0.01$).

El CasNa induce la expresión del gene de M-CSF y de su receptor.

Finalmente, se evaluó mediante ensayos de RT-PCR la capacidad del CasNa para inducir la expresión del gene del M-CSF y de su receptor (M-CSFR). Se emplearon oligonucleotidos específicos para el M-CSF y M-CSFR (Raivich, 1998) y de β -actina como control interno. El ARN fue extraído de células 32D cultivadas en presencia y ausencia de CasNa por 36, 48 y 60 horas para el gene del M-CSF y por 24 horas para el gene de M-CSFR, y se realizó una RT-PCR para evaluar la expresión de cada gene.

En todas las muestras se observa la expresión del control interno (β -actina), sin embargo sólo en las muestra de 32D tratadas con CasNa a los diferentes tiempo hay expresión del ARNm del M-CSF(figura 31A). Esto confirma lo observado en los ensayos de colonias y en el ELISA, el CasNa está induciendo la expresión y secreción de M-CSF en las células 32D. Además, se evaluó la expresión del gene para M-CSFR y se encontró que aunque está presente en ambas condiciones (figura 31B), al realizarse un análisis densitométrico hay un incremento en los niveles de ARNm para este receptor en los cultivos con CasNa (figura 31C).

El anticuerpo anti-M-CSF no revierte el efecto del CasNa en las células 32D

Si el CasNa reduce la proliferación e induce diferenciación de las células 32D al linaje monocito-macrófago, y además estimula la producción y secreción de M-CSF y aumenta los niveles de ARNm de su receptor, lo más probable es que mediante un mecanismo autócrino-parácrino el M-CSF producido sea el responsable del efecto de la diferenciación monocítica. Mecanismo que se comprobaría al adicionar anti-M-CSF y revertir el efecto del CasNa. Sin embargo, cuando se adicionó el anti-M-CSF a los cultivos de 32D tratados con CasNa por 48 y 96 horas no se observó una restauración de la proliferación (figura 32A y 32B). Aun si el anti-M-CSF se adiciona al inicio y se vuelve a adicionar a la mitad del tiempo de cultivo la recuperación es mínima (figura 32A y 32B). Por lo tanto, al menos en estas condiciones de cultivo, el anti-M-CSF no inhibe el efecto anti-proliferativo de 2mg/mL de CasNa y por consiguiente, el M-CSF no parece ser el principal responsable de los efectos del CasNa.

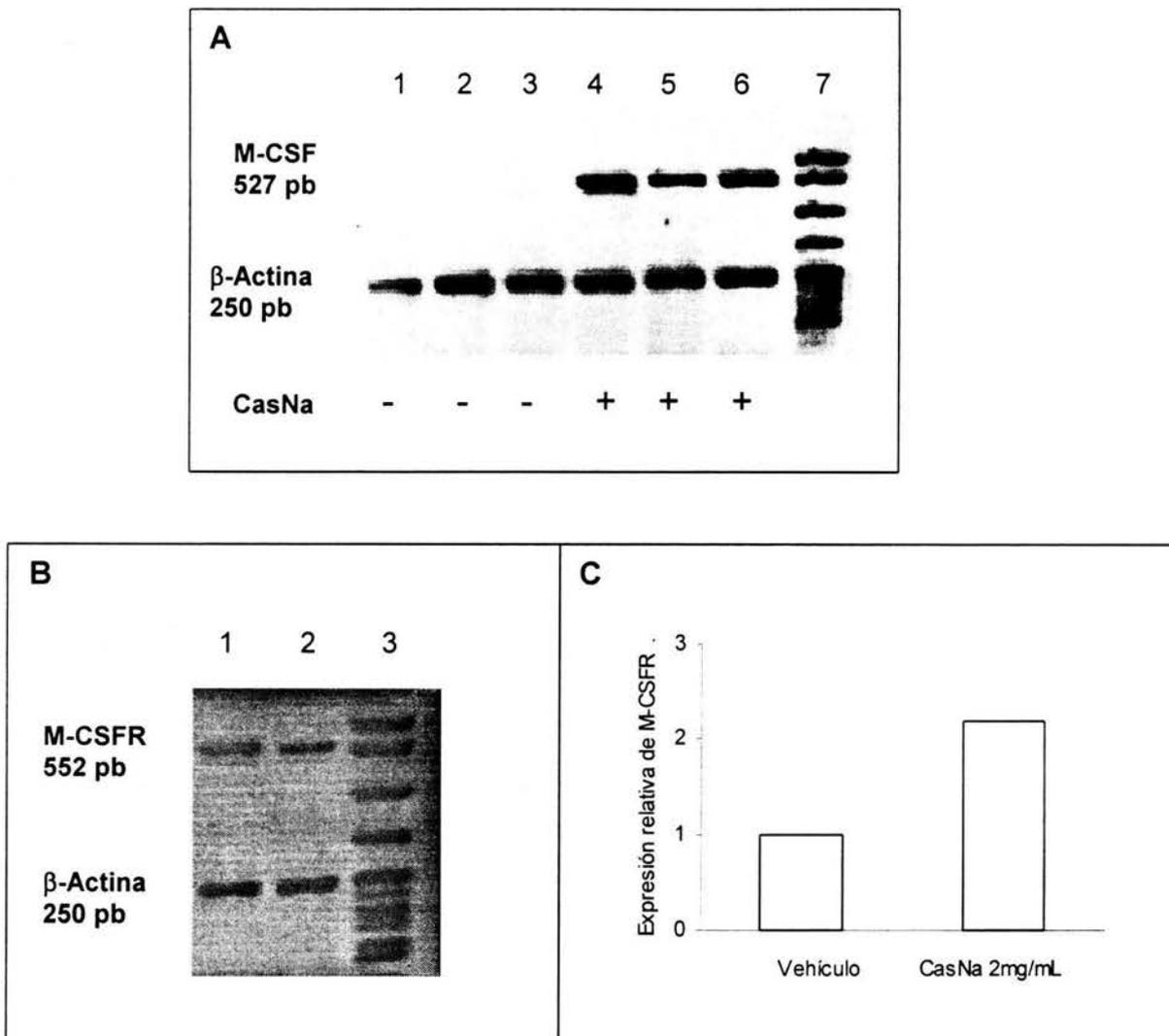


Figura 31. Identificación por RT-PCR de M-CSF y M-CSFR en las células 32D cultivadas en presencia o ausencia de CasNa (2 mg/mL). Se emplearon los oligonucleotidos específicos para M-CSF y su receptor (M-CSFR) y de β -actina como control interno. A) identificación de M-CSF; carriles 1, 2 y 3 en ausencia, carriles 4, 5 y 6 en presencia de CasNa por 36, 48 y 60 horas respectivamente y carril 7 marcadores de peso. B) Identificación M-CSFR en las células 32D cultivadas por 24 horas en presencia (carril 1) o ausencia (carril 2) de CasNa y marcadores de peso (carril 3). C) Análisis densitométrico de la expresión de M-CSFR.

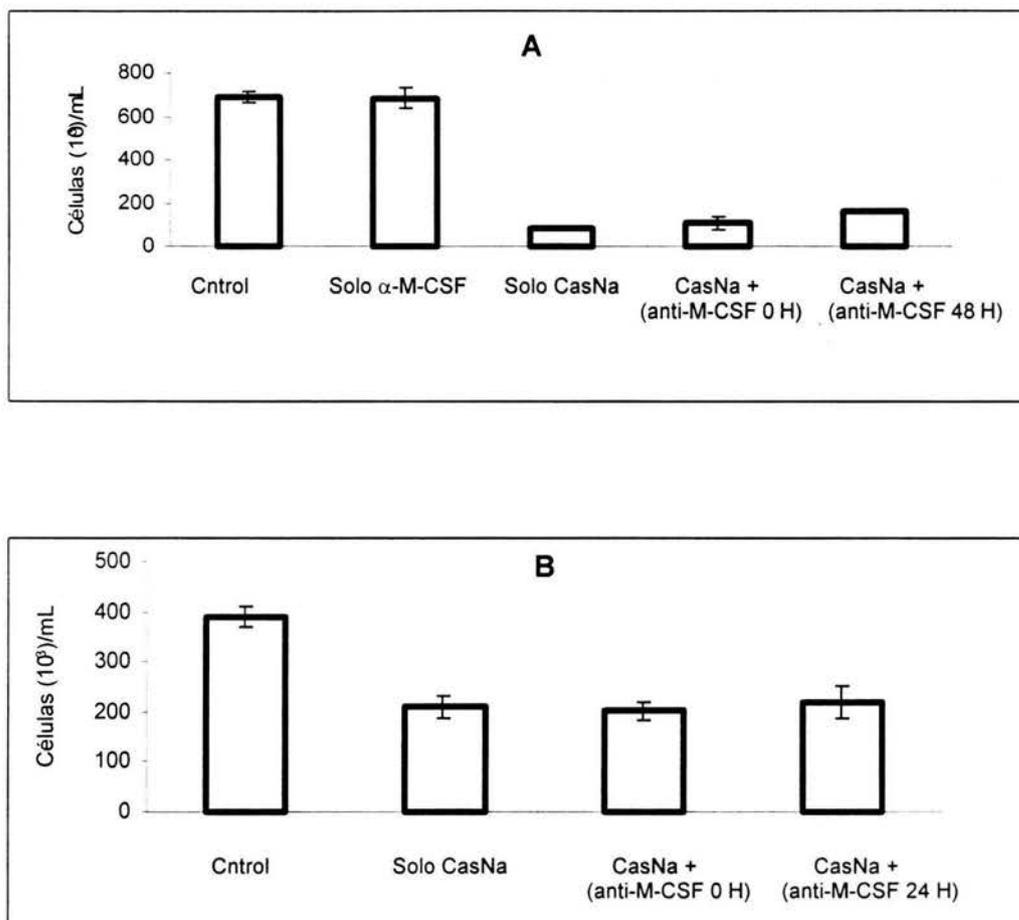


Figura 32. Inhibición del efecto de CasNa en la proliferación de las células 32D. Las células 32D fueron cultivadas por 96 horas (A) o por 48 horas (B) con solo vehículo (Control), solo anti-M-CSF o con solo (CasNa 2 mg/mL) o en presencia de anti-M-CSF adicionado a las 0 horas o a la mitad del tiempo de cultivo.

7. DISCUSIÓN

OBJETIVO 1. EVALUAR SÍ EL CasNa, LAS CASEÍNAS Y LAS CASOMORFINAS ALTERAN LA PROLIFERACIÓN E INDUCEN DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS 32D Y WEHI-3.

La leche y los productos lácteos son un alimento básico para la población en general. Sin embargo, además de su reconocido papel nutritivo, en las últimas décadas la atención ha sido puesta en las actividades biológicas atribuidas a algunos de sus componentes. De particular interés son las caseínas y varios péptidos obtenidos de su proteólisis enzimática conocidos como casomorfina. Las caseínas y las casomorfina, tienen efectos en el sistema nervioso (James y Kitchen, 2001; Blass y Blom, 1996), en la respuesta inmune (Wong et al, 1996; Heddeleson et al, 1997) y disminuyen o incrementan la agresividad de células tumorales (Tatsuta et al, 1992; Oliveira et al, 2003). Por lo anterior son propuestos como posibles reguladores fisiológicos con potenciales aplicaciones terapéuticas, no obstante, aun quedan muchas preguntas por contestar (Teschmacher et al, 1997). En lo referente a células hematopoyéticas, hasta la fecha las investigaciones son enfocadas a determinar su actividad en células maduras, como linfocitos, macrófagos y neutrófilos (Kayser y Meisel, 1996; Pessi et al, 2001), por lo que sus implicaciones en la hematopoyesis han sido poco exploradas. Considerando estos antecedentes, y con el objetivo de establecer los efectos en la hematopoyesis de estos compuestos, en el presente proyecto se determinó el papel de el CasNa, de las caseínas y de tres casomorfina, en la línea celular 32D.

Las células 32D son dependientes de IL-3 para su sobrevivencia y proliferación, no generan tumores en hospederos histocompatibles (Greenberger et al, 1983), y con el estímulo apropiado pueden originar neutrófilos (Valtieri et al, 1987), macrófagos (Kreider et al, 1990) o eritrocitos (Harris et al, 1998; Friedman et al, 1991). Por estas razones, son consideradas como una línea celular progenitora mieloide multipotencial no maligna, y ha sido un valioso modelo para el estudio de la hematopoyesis normal. Cuando las células 32D se cultivaron con varias dosis de CasNa, α -, β - o κ -caseína, la proliferación fue disminuida significativamente a partir de 0.1 mg/mL de CasNa y 0.5 mg/mL de las caseínas. En estudios previos, la β -caseína incrementa la proliferación de linfocitos estimulados con Concanavalina A (Wong et al, 1996), nuestros resultados parecen ser contrarios, sin embargo, los contextos son distintos, mientras que en linfocitos la

estimulación mitótica es parte de su activación (Janeway et al, 1999), en progenitores hematopoyéticos una reducción en la proliferación puede estar asociada a procesos propios de la hematopoyesis como la diferenciación y la maduración (Guo y Hay, 1999; Smith, 2003), no obstante, también se debe tener presente, que una disminución en la proliferación de cualquier tipo de célula puede ser consecuencia de citotoxicidad del compuesto de interés (Freshney, 1994). Por esta razón antes de determinar diferenciación, se evaluó la viabilidad de las células 32D cultivadas con CasNa y caseínas.

Los resultados mostraron, que sólo las dosis más elevadas afectaron significativamente la viabilidad, pero por lo general fue cercana al 90%. Estos datos coinciden con los trabajos en donde, linfocitos son expuestos hasta a 0.4 mg/mL de β -caseína (Wong et al 1996) o a 1 mg/mL de α -caseína (Pessi et al 2001), sin alterar la viabilidad. Por lo tanto, la reducción en la proliferación no es explicada por una disminución en la viabilidad, y puede estar asociada a la diferenciación.

Cuando se determinó la morfología de las células 32D en presencia de CasNa y caseínas, se observó un incremento significativo en el porcentaje de células del linaje monocito-macrófago. Además, se realizaron tinciones citoquímicas, y se determinó la aparición o el incremento de antígenos de superficie específicos de macrófagos y neutrófilos. En conjunto, los resultados indicaron que la reducción de la proliferación en las células 32D va acompañada de diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago. Es conocido que las células 32D en ausencia de IL-3 se puede diferenciar hacia el linaje granulocítico (Valtieri et al, 1987), mientras que en ausencia de IL-3 y presencia de G-CSF y GM-CSF se puede diferenciar hacia el linaje monocito-macrófago (Kreider et al, 1990). Nuestros resultados indican que a pesar de la presencia de IL-3, el CasNa y las caseínas tienen el potencial de frenar la proliferación e inducir diferenciación. Este dato sugiere que el CasNa puede ser un potente diferenciador de las células 32D. No se conocen los mecanismos mediante los cuales el CasNa o las caseínas puedan disminuir la proliferación e inducir diferenciación en células progenitoras hematopoyéticas. Algunos estudios indican que en presencia de IL-3, la transfección y la expresión de la proteína p19^{INK4d} provoca un paro en el ciclo celular y un aumento en la población macrofágica (Adachi et al, 1997), asimismo, la transfección de PKC- α o PKC- β inhibe la señal proliferativa de IL-3 e induce diferenciación monocítica (Kovanen et al, 2000). Apoyándonos en estos últimos antecedentes, es posible que el CasNa y las caseínas

inicien directamente la señal de diferenciación o bien, provoquen un paro en el ciclo celular y se promueva la diferenciación, por lo que será un interesante tema de estudio en un futuro.

Hasta ahora se ha reportado que el CasNa y la caseína son agentes quimiotácticos de neutrófilos y macrófagos (Pasotti et al, 1993), la β -caseína incrementa la estimulación mitótica de linfocitos T y B, la producción del anión superóxido en neutrófilos y la secreción de IL-1 β y TNF- α de macrófagos (Wong et al, 1990). Nuestros resultados aportan nuevas evidencias donde se indica, que la actividad de estos compuestos abarcan a células hematopoyéticas progenitoras, y colocan al CasNa y a las caseínas como compuestos con propiedades reguladoras de procesos fundamentales en la hematopoyesis, como lo es la diferenciación de progenitores mieloides (Ramos et al, 2000).

Otro aspecto sumamente interesante se deriva de los estudios epidemiológicos, que han asociado a la ingesta de leche y de productos lácteos con un efecto protector contra cáncer de colon (revisado en Norat y Riboli, 2003), de seno (Hjartaker et al, 2001) y de linfomas (Davis, 1998). Estos estudios van encaminadas a determinar el componente de la leche responsable del efecto protector. Con respecto a las caseínas, se ha reportado que en ratas, una alimentación rica en caseína disminuye el efecto cancerígeno de azoximetano (Tatsuta et al, 1992). En este contexto, y considerando que el bloqueo en alguna etapa de su diferenciación y su continua proliferación son las principales características de las células leucémicas (Passegué et al, 2003), y nuestros resultados indican que en las células 32D el CasNa y las caseínas inhiben la proliferación y favorecen la diferenciación, entonces, analizamos la posibilidad de que el CasNa o las caseínas puedan afectar la proliferación o diferenciación de las células leucémicas WEHI-3.

De manera general, nuestros resultados revelaron que el CasNa y las caseínas disminuyen la proliferación de las células WEHI-3. Sin embargo, a diferencia de las células 32D, fue necesario una dosis mayor de CasNa (1mg/mL) para inhibir significativamente su proliferación. Mientras que la κ -caseína mostró mayor potencial para inhibir la proliferación de WEHI-3 a diferencia de las células 32D, y el efecto en la proliferación de α - y β -caseína fue muy parecida en ambas líneas. Asimismo, las evaluaciones morfológicas y las tinciones citoquímicas indicaron que los porcentajes de células del linaje granulocítico y monocítico de las células WEHI-3 en presencia de CasNa y caseínas, no cambiaron con

respecto al cultivo con solo vehículo, pero en las determinaciones del antígeno específico de macrófagos, los índices de fluorescencia (IF) fueron casi del 1.5 con las caseínas, resultado que indiscutiblemente señala un incremento en la cantidad del antígeno, lo que se traduciría a un incremento en la diferenciación a macrófagos. Sin embargo, en la determinación de la expresión de este u otro antígeno de diferenciación, el incremento es significativo si la fluorescencia aumenta al menos 2 veces respecto al control (Li et al, 1993; Zhang et al, 1998; Smith et al, 1997; Hayashi et al, 1994), consecuentemente, si tomamos este criterio y las determinaciones morfológicas y citoquímicas, no tenemos evidencias para concluir que el CasNa o las caseínas inducen diferenciación de las células WEHI-3, y sólo nos limita a concluir que existe un ligero incremento en este antígeno. Por lo tanto, aunque estos son los primeros datos donde se indican que estos compuestos afectan directamente a células leucémicas, también apuntan un efecto diferencial con respecto a la línea hematopoyética 32D no maligna.

Existen antecedentes que sugieren diferencias en la respuesta a los mismos estímulos en ambas líneas celulares. En las células WEHI-3 el G-CSF no induce diferenciación granulocítica (Böhmer et al, 1988) y el GM-CSF no induce diferenciación monocítica (Smith et al, 1997), la diferenciación de las células WEHI-3 con G- o GM-CSF se obtiene sólo si se induce exógenamente la expresión del receptor de G-CSF (Li et al, 1993) o del de GM-CSF (Smith et al, 1997). Estas u otras diferencias pueden ser las responsables de que en las células WEHI-3 el CasNa y las caseínas reduzcan la proliferación pero no sufran diferenciación, como se observó en las células 32D.

Por otro lado, en los últimos años se ha mostrado que péptidos provenientes de la degradación enzimática de las caseínas tienen actividades biológicas (Revisado en Meisel 1997 y en Meisel y Bockelmann 1999), sumado a esto, la detección de algunos de estos péptidos en el sistema digestivo y en la circulación después de la ingestión de leche y productos lácteos (Chabance et al 1998), ha despertado un gran interés en determinar sus efectos fisiológicos. En células hematopoyéticas, el hidrolizado de la α -caseína reduce la activación de células T (Pessi, et al 2001) y el hidrolizado de la β -caseína incrementa *in vivo* los títulos de anticuerpos (Heddleson et al, 1997), así mismo, el péptido conocido como 1-7 β -casomorfina incrementa o suprime la capacidad proliferativa de linfocitos (Elitsur et al, 1991; Kayser y Meisel, 1996) y además, la 90-95 α -casomorfina, la 1-5 β -casomorfina y la 1-7 β -casomorfina reducen fuertemente la proliferación *in vitro* de líneas

celulares de cáncer de seno y próstata (Kampa et al, 1996; Hatzoglou et al 1996). Por lo que en el presente proyecto, evaluamos si estas tres casomorfina presentan efectos en las células 32D o en las células leucémicas WEHI-3. Los resultados señalaron que en las células 32D, sólo la dosis más alta de 1-5 β -casomorfina disminuyó hasta en un 50% la proliferación sin alterar la viabilidad, pero ninguna promovió un aumento en la diferenciación. Asimismo, las casomorfina no tuvieron efecto en la proliferación, viabilidad o diferenciación de la línea leucémica WEHI-3. Los resultado muestran, que péptidos como 1-5 β -casomorfina pueden afectar la hematopoyesis reduciendo la proliferación de células progenitoras, sin embargo, las dosis para tal efecto son relativamente altas, y no todas las casomorfina afectan la hematopoyesis.

A este respecto, se ha determinado que las concentraciones de casomorfina en productos lácteos son cercanas a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hernández et al, 1999), en el intestino las concentraciones de péptidos derivados de caseínas es de hasta de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Yvon et al, 1986), mientras que en la circulación se reportan concentraciones hasta de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptidos de la α - y κ -caseína en humanos después de la ingesta de leche o yogurt (Chabance et al, 1998). En el presente estudio la dosis de la 1-5 β -casomorfina que disminuyó la proliferación de las células 32D fue de 1 mM o 580 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por lo tanto, si estos péptidos fuesen generados después de la ingesta de leche o productos lácteos por enzimas digestivas y entraran a la circulación, su concentración no afectaría a células hematopoyéticas mieloides normales o leucémicas.

Los reportes del efecto de las casomorfina en células tumorales *in vitro*, señalan que concentraciones pico molares (pM) inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer de seno y próstata, razón por la cual son propuestas como compuestos terapéuticos contra estos tipos de cáncer (Kampa et al, 1996; Hatzoglou et al 1996), nuestros datos muestran que las casomorfina a dosis pM no afectan la hematopoyesis. Si consideramos, que una de las principales desventajas de las terapias anticancerígenas es la inmunosupresión del paciente provocada por el daño a las células hematopoyéticas (Hande, 1999), y si las dosis de casomorfina determinadas *in vitro* tienen el mismo efecto *in vivo*, entonces, las casomorfina cobran una mayor relevancia clínica, al ser compuestos que inhiben la proliferación de células tumorales sin afectar a células hematopoyéticas normales.

OBJETIVO 2. DETERMINAR SI EL EFECTO DE CasNa, CASEÍNAS Y CASOMORFINAS EN LAS CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS EN ESTUDIO ES MEDIADO POR RECEPTORES OPIOIDES

Para un mejor entendimiento de las posibles implicaciones fisiológicas de las caseínas y casomorfina, es de suma importancia determinar los mecanismos mediante los cuales actúan. En los estudios *in vivo* e *in vitro* la actividad de las casomorfina es parcialmente inhibida por la adición de antagonistas de receptores opioides, como el naloxone (NLX). Por lo que se ha determinado, que la activación de receptores opioides sea una de las principales vías de acción de estos compuestos (Meisel, 1997; Hatzoglou A *et al*, 2000), e incluso se ha propuesto que la β -caseína también actúe a través de este tipo de receptores (Wong *et al*, 1996). Sumado a esto, se ha demostrado la presencia y funcionalidad de receptores opioides en células hematopoyéticas progenitoras y maduras (Hagi *et al*, 1995; McCarthy *et al*, 2001). Considerando estos antecedentes, se evaluó si los receptores opioides están implicados en la disminución en la proliferación de las células 32D y WEHI-3 tratadas con CasNa, las caseínas y las casomorfina.

En los cultivos de las células 32D con 1-5 β -casomorfina la proliferación fue del 63.01%, pero si además de 1-5 β -casomorfina se adiciona NLX (31.3 mM), la proliferación es del 85.17% esto nos indica, que el antagonista opioide NLX revierte el efecto antiproliferativo de la casomorfina en más del 50%. Hasta ahora no existe reportes del efecto de casomorfina en células progenitoras hematopoyéticas, pero en ensayos similares con otros tipos de células, el porcentaje de regresión de las casomorfina por NLX u otros antagonistas nunca llega al 100% (Kampa *et al*, 1996), y sea planteado que sea por la intervención de otros tipos de receptores como el de somatostatina (Hatzoglou *et al*, 2000). Si consideramos que el NLX es un antagonista clásico de receptores opioides y que es ampliamente usado para revelar la actividad de casomorfina en células tumorales (Kampa *et al*, 2000; Hatzoglou *et al*, 2000), el hecho de que el NLX revierte la inhibición de la proliferación de las células 32D inducida por 1-5 β -casomorfina constituye una evidencia que los receptores opioides están presentes en las células 32D y son funcionales, además de que la 1-5 β -casomorfina puede modular la hematopoyésis al menos en esta línea celular, sería interesante estudiar el tipo de receptor opioide implicado, así como su relevancia en la hematopoyésis normal.

En las células 32D y WEHI-3 cultivadas con CasNa, α -, β - o κ -caseína el NLX no provocó una regresión significativa de la reducción de la proliferación, y por el contrario en algunas condiciones existe un ligero incremento, que aunque significativo puede explicarse por el efecto del propio NLX, ya que como se observó en los resultados, el NLX también reduce la proliferación de las células 32D y WEHI-3. Estos resultados nos indican, que el CasNa y las caseínas no actúan vía receptores opioides en estas células. Sin embargo, existe un reporte donde empleando caseína fluorescente y citometría de flujo, proponen la existencia de receptores específicos para caseína en neutrófilos y monocitos (Lewis y Van Epps, 1983), consecuentemente, la existencia de algún tipo de receptor para el CasNa y las caseínas en las células 32D y WEHI-3 no debe ser descartada.

Finalmente, el hecho de que 1-5 β casomorfina actúe mediante de receptores opioides a diferencia del CasNa y las caseínas implica, que a pesar de que las casomorfina sean producto de la degradación enzimática de las caseínas, el mecanismo de acción no es compartido, y tal vez explique el por que, las casomorfina en las células 32D, sólo disminuyeron la proliferación sin inducir diferenciación, y en las células WEHI-3 las casomorfina no tuvieron efecto alguno.

OBJETIVO 3. EVALUAR LA POSIBLE INTERVENCIÓN DE ALGÚN FACTOR DE CRECIMIENTO HEMATOPOYÉTICO (FCH) EN LOS EFECTOS OBSERVADOS EN LAS CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS UTILIZADAS

Diversos estudios señalan que el CasNa y las caseínas estimulan la producción de citocinas tanto *in vivo* como *in vitro*. Ratones alimentados con una dieta libre de proteínas sufren reducción en la eritropoyesis, misma que es restaurada cuando los ratones son alimentados con una dieta a base de caseína, la restauración es acompañada de un aumento en los niveles de eritropoyetina (Okano et al, 1992). Asimismo, el CasNa al ser inyectado intraperitonealmente en ratones, incrementa los niveles de G-CSF y M-CSF, en el suero y en el exudado de la cavidad peritoneal (Lotem y Sachs, 1985), y en el laboratorio se ha determinado que el CasNa provoca secreción de M-CSF en células en banda de médula ósea de ratón (Bautista, 1998). Por lo que, la secreción citocinas y su intervención en los efectos llevados a cabo el CasNa y las caseínas, es otra hipótesis para explicar el mecanismo de acción de estos compuestos.

Cuando las células 32D son cultivadas con CasNa, el medio condicionado tiene actividad estimuladora de colonias, y la mayor parte de las colonias son del linaje monocito-macrófago. Considerando que la citocina encargada de esta actividad es el M-CSF, se realizaron ensayos para identificar la presencia de esta citocina. Los resultados apuntan a que las células 32D en presencia de CasNa producen y secretan M-CSF, y además, aumentan los niveles de ARNm para su receptor (M-CSFR o *fms*), y como se determinó en los ensayos de diferenciación, el CasNa también incrementa la expresión del M-CSFR (Ramos et al, 2004). Estos resultados nos hicieron proponer un mecanismo autócrino/parácrino, donde el M-CSF producido y la interacción con su receptor sean los responsables de los efectos observados. Sin embargo, la disminución en la proliferación provocada por el CasNa no fue anulada al emplearse el anticuerpo α -rmM-CSF. Por lo tanto, es posible que el CasNa en las células 32D actúe por la unión a algún tipo de receptor y sea el principal responsable de la reducción en la proliferación y diferenciación, y el M-CSF y su receptor tengan un papel secundario o sólo sean importante en la diferenciación.

Además del mecanismo propuesto existen dos vías independientes de la participación de M-CSF u otra citocina mediante las cuales se inhibe la proliferación y se induce la diferenciación de las células 32D al linaje monocito-macrófago; en la primera se

sobre-expresa la proteína p19^{INK4d} un regulador negativo del ciclo celular que actúa inhibiendo la acción de proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK4 y CDK6) (Adachi et al, 1997) y en la segunda la sobre-expresión PKC- α (Proteína Cinasa C) o PKC- δ bloquea la señal proliferativa de IL-3 al inhibir a la proteína Jak (Janus Cinasa) (Kovanen P et al, 2000), por lo tanto, la participación de reguladores negativos del ciclo celular o de proteínas inhibitorias de la señal proliferativa es una posible explicación del mecanismo de acción del CasNa y de las caseínas en la hematopoyesis.

8. PERSPECTIVAS

La leche es un producto exclusivo de mamíferos y es de particular importancia en la dieta humana, pero, además de su reconocido papel nutritivo, los constituyentes de la leche son capaces de llevar información específica al organismo que la consume, razón por la cual los estudios encaminados a determinar las actividades biológicas de sus componentes han cobrado la mayor importancia.

En este trabajo se evaluó el efecto de siete compuestos en una línea celular no maligna y en una leucémica. No todos presentaron los mismos efectos, por lo tanto, la elección de uno u otro dependerá de los objetivos a plantearse en posteriores proyectos. Por ejemplo, el CasNa y las caseínas presentaron el mayor efecto en la diferenciación de las células 32D, y además, el CasNa provocó la expresión del gene del M-CSF y su receptor, por lo tanto, para determinar si estos compuestos regulan la hematopoyesis mediante la expresión de factores inhibidores o estimuladores como interferones, interleucinas o factores de crecimiento hematopoyético, las células 32D y el CasNa o las caseínas son un buen modelo.

Por otro lado, la κ -caseína presentó el mayor efecto en la inhibición de la proliferación de las células leucémicas WEHI-3 y presentó algunos indicios de diferenciación. Será de gran relevancia determinar si tiene el mismo efecto *in vivo*; un buen modelo para este fin es emplear ratones Balb-c, pues ya se ha visto que generan leucemia al ser inoculados con células WEHI-3 (Hayashi et al, 1994, Fujii et al, 1999), mismos que podrían ser tratados con κ -caseína y determinar si incrementan el tiempo de sobrevivencia, o hay eliminación o diferenciación de las células leucémicas, como ya se ha visto con el G-CSF en este modelo (Hayashi et al, 1994), también podrían realizarse evaluaciones en cultivos primarios de médula ósea de personas sanas y de pacientes con alteraciones en su sistema hematopoyético como leucemias mieloides. Estos ensayos determinarían la importancia clínica de estos compuestos.

Además de las obtenidas en el presente proyecto, se han reportado una serie de actividades para el CasNa y las caseínas, sin embargo, no hay reportes del tipo de receptor o mecanismos mediante los cuales actúan. Con el empleo de caseínas marcadas y mediante ensayos de competitividad se determinaría si existe un receptor para estos compuestos en células 32D o WEHI-3, y posteriormente se podría identificar al receptor, y proponer un mecanismo de acción, esto cerraría el circuito de comunicación ligando-

receptor, parte primordial en las investigaciones sobre las implicaciones fisiológicas de los componentes de la leche.

Aunque el efecto *in vitro* con las caseínas y el CasNa es contundente, fisiológicamente después de la ingesta de leche o productos lácteos, sólo los péptidos productos de la degradación enzimática de las caseínas pueden ser absorbidos y tener efectos sistémicos, por lo tanto; será sumamente relevante determinar si existe la generación de péptidos en los cultivos de 32D o WEHI-3 en presencia de las caseínas. Esta posibilidad cobra importancia por que ya se ha reportado, que una variedad de células, entre ellas células hematopoyéticas presentan ectopeptidasas transmembranales capaces de degradar diversos enlaces peptídicos (Bauvois, 2001; Antczak et al, 2001; Joshi et al, 2001) e incluso granulocitos y macrófagos degradan parcialmente a la β -caseína (Verdi y Barbano, 1991). Además, reportes recientes señalan que en médula ósea péptidos conocidos como mielopéptidos se generan enzimáticamente de la hemoglobina y son capaces de regular la hematopoyesis *in vivo* (Petrov et al, 1997). Por lo tanto, si alguna parte de la molécula del CasNa o de las caseína, son las responsables de los efectos encontrados, el consumo de leche o productos lácteos tendrá un potencial papel en la regulación de la hematopoyesis.

9. CONCLUSIÓN

El CasNa y las caseínas inducen la diferenciación de las células progenitoras mieloides 32D, en las células leucémicas WEHI-3 reducen la proliferación, pero no inducen diferenciación. Las casomorfina no tienen actividad en las células WEHI-3, y sólo la 1-5 β -casomorfina afecta hasta en un 50% la proliferación de las células 32D, sin inducir diferenciación. Respecto al posible mecanismo de acción se determinó que, en la reducción de la proliferación de las células empleadas, los receptores opioides sólo están implicados en la actividad en las células 32D de la 1-5 β -casomorfina. Asimismo el CasNa induce la expresión y producción de M-CSF y de su receptor en las células 32D, sin embargo estas moléculas no están involucradas en la reducción de la proliferación provocada por el CasNa. Estos resultados señalan, que además de la gran variedad de reguladores de la hematopoyesis ya conocidos, ésta puede ser afectada por moléculas que están en estrecha relación con los humanos desde su nacimiento.

10. ANEXO 1

Criterios para determinar el estadio de diferenciación de las células 32D y WEHI 3 teñidas con el colorante Wright.

Blasto

Núcleo redondo o ligeramente oval

Citoplasma no granuloso y de color azulado

Células redonda o con algunas prolongaciones (pequeñas)

Células relativamente pequeña casi similar al neutrófilo

Relación núcleo citoplasma alta, casi todo el espacio es ocupado por el núcleo

LINAJE GRANULOCITO-NEUTRÓFILO

Promielocito/mielocito

Aparición de gránulos (oscuros o rojizos)

Relación núcleo citoplasma menor al blasto

Comúnmente de mayor tamaño que el blasto

Inicio de aplastamiento del núcleo (puede ser oval)

Metamielocito

Núcleo hendido (arriñonado)

Gránulos rojizos

Relación núcleo/citoplasma menor al promielocito/mielocito

Banda

Núcleo en forma de banda no segmentado-

Gránulos

Relación núcleo/citoplasma pequeña

Neutrófilo polimprfonuclear

Núcleo separado en lóbulos

Gránulos

LINAJE MONOCITO-MACRÓFAGO

Promonocito

Núcleo generalmente redondo o reniforme

El núcleo puede presentar circunvoluciones (aspecto de cerebro)

El citoplasma pueden presentar pseudópodos

Citoplasma gris-azulado, más claro que blastos y de granulocitos

Vacuolas digestivas

Relación núcleo-citoplasma menor (presenta gran cantidad de citoplasma)

Monocito

El monocito tiene las características del promonocito pero más pronunciadas .

(Diggs et al 1971, Cartwright 1973, McDonald et al, 1998)

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi M, Roussel M, Havenith K, Sherr C. Features of macrophage differentiation induced by p19^{ink4d}, a specific inhibitor of cyclin D-dependent kinases. *Blood* 1997;90:126-137.
- Akashi K, Reya T, Dalma-Weishausz D, Weissman I. Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* 2000a;12:144-150
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman I. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000b;404:193-197.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Molecular biology of the cell. 3ra. ed. Garland Publishing. USA, 1994.
- Antczak C, Meester I, Bauvois B. Ectopeptidases in pathophysiology. *BioEssays* 2001;23:251-260.
- Ardavin C, Martínez G, Martín P, Anjué, F, Arias C, Marín A, Ruiz S, Parrillas V, Hernández H. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 2001;22:691-700.
- 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;19:652-657.
- Aschkenasy A. Effets comparés de la caséine et de divers mélanges amino-acides sur la restauration de l'érythropoïèse, 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.
- Baggiolini M. Chemokines and leucocyte traffic. *Nature* 1998;392:565-570
- Barreda D, Hanington P, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Com Immunol* 2004;28:509-554.
- Bartard P, Monjer M, Fortunel N, Ducos K, Sansilvestri-Morel P, Phan T, Hatzfeld A, Hatzfeld J. TGF- β 1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci* 2000;113:383-390.
- 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.
- Bauvois B. Transmembrane proteases in focus: diversity and redundancy? *J Leukoc Biol* 2001;70:11-17.

Befus A, Denburg J. Basophilic leucocytes: Mast cells and basophils. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. Wintrobe's Clinical Hematology. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:362-376.

Berthou J, Migliore-Samour D, Lifchitz A, Deletré J, Floch F, Jollés P. Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. *FEBS Lett* 1987;218:55-58.

Blanco P, Riminucci M, Grothos S, Robey P. Bone marrow stromal stem cell: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-192.

Blass E, Blom J. β -Casomorphin causes hypoalgesia in 10-day-old rats: Evidence for central mediation. *Pediatric Res* 1996;39:199-203.

Bohmer R, Burgess A. Granulocytic colony-stimulating factor (G-CSF) does not induce differentiation of WEHI-3B (D+) cells but is required for the survival of the mature progeny. *Int J Cancer* 1988;42:53-58.

Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol* 2002;197:443-440.

Bondurant M, Koury M. Origin and development of blood cells. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. Wintrobe's Clinical Hematology. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:145-168.

Boranic M, Krizanac-Bengez L, Gabriovac J, Marotti T, Breljak D. Enkephalins in hematopoiesis. *Biomed Pharmacother* 1997;51:29-37.

Brivanlou A, Darnell J. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 2002;295:813-818.

Brodbeck U, Ebner K. The subcellular distribution of the A and B proteins of lactose synthetase in bovine and rat mammary tissue. *J Biol Chem* 1966;241:5526-5532.

Broudy V. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997;90:1345-1364.

Broxmeyer H, Kim C. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol* 1999;27:1113-1123.

Carr J, Kim H, DeCosta B, Jacobson A, Rice K, Blalock E. Evidence for a δ -class opioid receptor on cells of the immune system. *Cell Immunol* 1988;116:44-51.

Carr J, DeCosta B, Jacobson A, Rice K, Blalock E. Enantioselective kappa opioid binding sites on the macrophage cell line P388d. *Life Sci* 1991;49:45-51.

Cartwright GE. El laboratorio en el diagnostico hematológico. 4ta ed. Barcelona, Científico-Médica, 1972.

Chabance B, Marteau P, Rambaud J, Samour M, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jolles P, Fiat AM. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 1998;80:155-165.

Chiappelli F, Kavelaars A, Heijnen C. β -Endorphin effects on membrane transduction in human lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1992;211-217.

Chiba H, Tani F, Yishikawa M. Opioid antagonist peptides derived from k-casein. *J Dairy Res* 1989;56:363-366.

Clare H, Swaisgood H. Bioactive milk peptides: A prospectus. *J Dairy Sci* 2000;83:1187-1195.

Claustre J, Toumi F, Trompette A, Jourdan G, Guignard H, Chayvialle J, Plaisancie P. Effects of peptides derived dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G521-G528.

Coligan J, Kruisbcek A, Margulies D, Shevach E, Strober W, editores. Current protocols in immunology. Wiley Interscience John Wiley & Sons USA, 1992.

Cousar J. The hematopoietic-lymphoid neoplasms: Principles of diagnosis En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. Wintrobe's Clinical Hematology. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:1993-1997.

Danielson P, Dores R. Molecular evolution of the opioid/orphanin gene family. *Gen Comp Endocrinol* 1999;113:169-186.

Davis M. Review of the evidence for an association between infant feeding and childhood cancer. *Int J Cancer* 1998; Supp 11:29-33

Diggs LW. La morfología de las células de la sangre humana. En frotis de sangre periférica y de médula ósea teñidos con el colorante de Wright. Chicago. Abbott Laboratories. USA, 1971.

Elitsur Y, Luk G. Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol* 1991;85:493-497.

Fantl W. Distinct phosphotyrosines on a growth factor receptor bind to specific molecules that mediate different signaling pathways. *Cell* 1992;69:413-423.

Freshney R. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 3ra. ed. Wiley-Liss, Inc. USA, 1994.

Friedman A, Krieder B, Venturelli D, Rovera G. Transcriptional regulation of two myeloid-specific genes, myeloperoxidase and lactoferrin, during differentiation of the murine cell line 32D Cl3. *Blood* 1991;78:2426-2432.

- Fujii S, Hamada H, Fujimoto K, Shimomura Y, Kawakita M. Activated Dendritic cell from bone marrow cells of mice receiving cytokine-expressing tumor cells are associated with the enhanced survival of mice bearing syngeneic tumors. *Blood* 1999;93:4328-4335.
- Futterman S, Heller J. The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinal complexed with bovine serum albumin, β -lactoglobulin and the retinol-binding protein of human plasma. *J Biol Chem* 1972;247:5168-5172.
- Gavériaux C, Peluso J, Simonin F, Laforet J, and Kieffer B. Identification of κ - and δ -opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett* 1995;369:272-276.
- Gillies R, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 1986;159:109-113.
- Golub E, Pagan T, Sun I, May A, Cranel F, Isom G. Can opioids regulate hemopoietic differentiation? *Ann NY Acad Sci* 1988;521:123-128.
- Greenberger J, Sakakeeny M, Humphries R, Eaves C, Eckner R. Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2931-2935.
- Guo M, Hay B. Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:745-752.
- Hagi K, Inaba K, Sakuta H, Muramatsu S. Enhancement of murine bone marrow macrophage differentiation by β -endorphin. *Blood* 1995;86:1316-1321
- Hande K. Principles and pharmacology of chemotherapy. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. Wintrobe's Clinical Hematology. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999: 2076-2101.
- Harris K, Hu X, Schultz S, Arcasoy M, Forget B, Clare N. The distal cytoplasmic domain of the Erythropoietin receptor induces granulocytic differentiation in 32D cells. *Blood* 1998;92:1219-1224.
- Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martin PM, Castanas E. Antiproliferative and receptor binding properties of α - and β -casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol* 1996;310:217-223.
- Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kampa M, Panagiotou S, Martin PM. Somatostatin and opioid receptors in mammary tissue. *Adv Exp Med Biol* 2000;480:53-63.
- Hayashi M, Okabe-Kado J, Hozumi M. Flow-cytometric analysis of in vivo induction of differentiation of WEHI-3B myelomonocytic leukemia cells by recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 1994;22:393-398.

Heddleson R, Park O, Allen J. Immunogenicity of casein phosphopeptides derived from tryptic hydrolysis of β -casein. *J Dairy Sci* 1971;80:1971-1976.

Heldin C. Signal transduction: Multiple pathways, multiple options for therapy. *Stem Cells* 2001;19:295-303.

Hernandez-Sanchez, Belloso-Morales, Jaramillo-Flores. Determination of δ -casomorphins in some Latin American dairy products. The IFT Annual Meeting. 1999.

Hestdal K, Ruscetti F, Ihle J, Jacobsen S, Dubios C, Kopp W, Longo D, Keller J. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol* 1991;147:22-28.

Hjartaker A, Laake P, Lund E. Childhood and adult milk consumption and risk of premenopausal breast cancer in a cohort of 48,844 women-The Norwegian women and cancer study. *Int J Cancer* 2001;93:888-893.

James R, Kitchen I. Influence of maternal milk on functional activation of δ -opioid receptors in postnatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:744-748.

Jandl J. Blood: Pathophysiology. 1ra ed. Blackwell Scientific Publications, Inc. USA, 1991

Janeway C, Travers P, Walport M, Capra J. Immunobiology: The immune system in health and disease. 4ta. Ed. Current Biology Pub. USA, 1999.

Jinsmaa Y, Yoshikawa M. Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. *Peptides* 1999;20:957-962.

Jolles P, Levy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillensen D, Thomaidis A, Dunn F, Caen J. Analogy between fibrinogen. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *Eur J Biochem* 1986;158:379-382.

Joshi D, Dang A, Yadav P, Qian J, Bandari P, Chen K, Donnelly R, Castro T, Gascon P, Haider A, Rameshwar P. Negative feedback on the effects of stem cell factor on hematopoiesis is partly mediated through neutral endopeptidase activity on substance P: a combined functional and proteomic study. *Blood* 2001;98:2697-2706.

Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Martin P, Castanas E. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α_{S1} -casein (α_{S1} -casomorphin, and α_{S1} -casomorphin amide). *Biochem J* 1996;319:903-908.

Kaushansky K. The enigmatic megakaryocyte gradually reveals its secrets. *BioEssays* 1999;21:353-360.

Kavelaars A, Ballieux R, Heinen C. Two different signalling pathways for the induction of immunoreactive β -Endorphin secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* 1991;128:765-770.

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

Kendall R. Erythropoietin. *Clin Lab Haem* 2001;23:71-80.

Kieffer B. Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: Receptors for opioid peptides. *Cell Mol Neurobiol* 1995;15:615-634.

Koletzko B, Aggett P, Bindels J, Bong P, Ferre P, Gil A, Lentze M, Roberfroid M, Strobel S. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British J Nutrition* 1998;80, Suppl 1, S5-S45.

Kon S. La leche y los productos lácteos en la nutrición humana. 2da. ed. FAO, Rumania, 1977.

Kondo M, Weissman I, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661-672.

Kovanen P, Junttila I, Saharinen P, Valmu L, Li W, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 tyrosine kinase by protein kinase C during macrophage differentiation of IL-3-dependent myeloid progenitor cells. *Blood* 2000;95:1626-1632.

Krebs D, Hilton D. SOCS Proteins: Negative regulators of cytokine signaling. *Stem cells* 2001;19:378-387.

Kreider B, Phillips P, Prystowsky M, Shirsat N, Pierce J, Tushinski R, Rovera G. Induction of the Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor by granulocyte CSF increases the differentiative options of a murine hematopoietic progenitor cell. *Mol Cell Biol* 1990;10:4846-4853.

Krizanac-Bengez L, Boranic M, Testa N. Naloxone behaves as opioid agonist/antagonist in clonal cultures of mouse bone marrow cells. *Biomed Pharmacother* 1995;49:27-31.

Kueng W, Silber E, Eppenberger. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 1989;182:16-19.

Lemischka L. Microenvironmental regulation of hemopoietic stem cells. *Stem Cells* 1997;15:63-68.

Lewin B. Genes. 7ma. ed. Marban, S.L. Madrid, España 2001.

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

- Li C, Yam L, Crosby W. Histochemical characterization of cellular and structural elements of the human spleen. *J Histochem Cytochem* 1972;20:1049-1058.
- Li J, Koay D, Xiao H, Sartonelli A. Regulation of the differentiation of WEHI-3BD+ leukemia cells by Granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Cell Biol*; 1993;120:1481-1489.
- Ling K, Dzierzak. Ontogeny and genetics of the hemato/lymphopoietic system. *Curr Opin Immunol* 2002;14:186-191.
- Locksley R, Killen N, Leonardo M. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
- Loh H, Smith A. Molecular characterization of opioid receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:123-147.
- Lotem J, 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.
- Makman M, Bilfinger T, Stefano G. Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J Immunol* 1995;154:1323-1330.
- Massaqué I. TGF β signal transduction. *Ann Rev Biochem* 1998;67:753-791.
- McCarthy L, Wetzel M, Sliker J, Eisenstein, Rogers T. Opioids, opioid receptors, and the immune response. *Drug Alcohol Dependence* 2001; 62:111-123.
- Mc Donald G, Paul J, Cruickshank B. Atlas de Hematología. 5ta ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid España, 2001.
- Meisel H, Schlimme E. Inhibitors of angiotensin converting enzyme derived from bovine casein (casokininas). En: Brantl V, Teschemacher H, editores. β -casomorphins and related peptides: Recent developments. UCH Germany ,1994: 27-33.
- Meisel H. Biochemical Properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 1997;43:119-128.
- Meisel H and Bockelmann W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leewenhock* 1999;76:207-215.
- Metcalf D. Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: Are our dogmas correct?. *Ann NY Acad Sci* 1999;872:289-303.
- Metcalf D, Nicola N. Direct proliferative actions of stem cell factor on murine bone marrow cells *in vitro*. Effects of combination with colony-stimulating factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6239-

- Metcalf D, Robb L, Dunn A, Mifsud S, 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.
- Migliore-Samour D, Jollés P. Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn?. *Experientia* 1988;44:188-193.
- Moqbel R, Becker A. The human eosinophil. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:351-364.
- Morrison S, Weissman I. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994;1:661-673.
- Muehlenkamp M, Warthesen J. β -Casomorphins: Analysis in Cheese and susceptibility to proteolytic enzymes from *Lactococcus lactis ssp. cremoris*. *J Dairy Sci* 1996;79:20-26.
- Munker R, Hiller E, Paquette R. *Modern hematology*. 1ra ed. Human Press USA, 2000.
- Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Ann Rev Genet* 1999;33:29-55.
- Nelson P, Krensky A. Chemokines, chemokines receptors, and allograft rejection. *Immunity* 2001;14:377-386
- Norat T, Riboli E. Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *Eur J Clin Nut* 2003;57:1-17.
- Noursadeghi M, Bickerstaff M, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys M. Production of Granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J Immunol* 2002;169:913-919.
- Nunez F. *Flow cytometry for research scientists: Principles and applications*. 1ra. ed. Horizon Press. Great Britain, 2001.
- 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 Nut* 1992;122:1376-1383.
- Oliveira M, Damme J, Corte V, Vaneechoutte M, Goethals M, Ahmadain M, Muller O, Vandekerckhove J, Mareel M, Leroy A. β -casein-derived peptides, produced by bacteria, stimulate cancer cell invasion and motility. *EMBO J* 2003;22:6161-6173.
- Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602:73-87.

Papayannopoulou T, Craddock C. Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells. *Acta Haematol* 1997;97:97-109.

Paraskevas F. Cell interactions in the immune response. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999a:544-615.

Parakevas F. T lymphocytes and NK cells: En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999b:497-543.

Paraskevas F, Foerster J. The lymphatic system. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999b:430-463.

Parker F, Migliore-Samour D, Floch F, Zerial F, Werner G, Jollés J, et al. Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence synthesis and biological properties. *Eur J Biochem* 1984;145:677-682.

Passegué E, Jamieson C, Ailles L, Weissman I. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11842-11849.

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

Pérez M, Calvo M. Interaction of β -Lactoglobulina with Retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: A review. *J Dairy Sci* 1994;78:978-988.

Permyakov E, Berliner L. α -Lactalbumin: Structure and function. *FEBS Lett* 2000;473:269-274.

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

Piazza F, Valens J, Lagasse E, Schindler C. Myeloid differentiation of FdCP1 cells is dependent on Stat5 processing. *Blood* 2000;96:1358-1365.

Ping-Yee L and Horace H. Regulation of opioid receptor activities. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:607-624.

Pluznik D, Sachs L. The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 1965;66:319-324.

Power C. Knock out models to dissect chemokine receptor function in vivo. *J Immunological Met* 2003;273:73-82.

Pretov R, Mikhailova A, Fonina L. Bone marrow immunoregulatory peptides (Myelo-peptides): Isolation, structure, and functional activity. *Biopolymers* 1997;43:139-146.

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

Quesenberry P, Colvin G, Lambert J. The chiaroscuro stem cell: A unified stem cell theory. *Blood* 2002;100:4266-4271.

Rabgaoui N, Guérin M, and Torreilles J. Casein-derived peptides can modulate the production of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid in human neutrophils. *Biochem Cell Biol* 1994;72:305-310.

Radcliff G, Jaroszeski M. Basics of flow cytometry. En: Jaroszeski M, Heller R, editores. Flow cytometry protocols. Human Press. USA, 1998:1-24.

Raivich G, Haas S, Werner A, Klein MA, Kloss C, Kreutzberg GW. Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: A quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *J Compara Neurol* 1998;395:342-358.

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;52:638-644.

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 Macrophage colony stimulating factor. *Arch Med Res* 2004;35:109-113.

Read L, Lord A, Brantl V, Koch G. Absorption of β -casomorphins from autoperfused lamb and piglet small intestine. *Am J Physiol* 1990;259:6443-6452.

Reya T, Morrison S, Clarke M, Weissman I. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111.

Rittner H, Brack A, Macheiska H, Mousa S, Bauer M, Schafer M, Stein C. Opioid peptide-expressing leukocytes. *Anesthesiol* 2001;95:500-508.

Rollins B. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-915.

Roy S, Sedqi M, Ramakrishnan S, Barkw R, Loh H. Differential effects on opioids on the proliferation of a macrophage cell line, Bac 1.2F5. *Cell Immunol* 1996;169:271-277.

Sandré C, Gleizes A, Forestier F, Gorges-Kergot R, Chilmonczyk S, Léonil J, Moreau MC, Labarre C. A peptide derived from bovine β -casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germfree and human flora-associated mice. *J Nutr* 2001;131:2936-2942.

Sawyers C. The hematopoietic-lymphoid neoplasms: Molecular genetics of acute leukemia. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. Wintrobe s Clinical Hematology. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:1998-2008.

Sharp B, McAllen K, Gekker G, Shahabi N, Peterson P. Immunofluorescence detection of δ Opioid receptors (DOR) on human peripheral blood CD4⁺ T cells and DOR-dependent suppression of HIV-1 expression. *J Immunol* 2001;167:1097-1102.

Schmidt M, Zickler P, Hoffman G, Haas S, Wissier M, Muessing A, Tisdale J, Kuramoto K, Andrews R, Wu T, Kiem T, Dunbar C, Kalle C. Polyclonal long-term repopulating stem cells clones in a primate model. *Blood* 2002;100:2737-2743.

Simmons P, Levesque J, Zannettino A. Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* 1997;10:485-492

Skubitz K. Neutrophilic leukocytes. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. Wintrobe s Clinical Hematology. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:300-350.

Smith A, Metcalf D, Nicola N. Cytoplasmic domains of the common β -chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors that are required for inducing differentiation or clonal suppression in myeloid leukaemic cell lines. *EMBO J* 1997;16:451-464.

Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 2003;10:9-16

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.

Stenberg P, Hill R. Platelets and megakaryocytes. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. Wintrobe s Clinical Hematology. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:615-660.

Sun T, Li C, Yam L. Atlas of cytochemistry and immunochemistry of hematologic neoplasms. ASCP Press, Chicago, IL. USA 1985.

Svedberg J, De Hams J, Leimenstoll, Teschemacher H. Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in vitro digests of bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides Fayetteville* 1985;6:825-830.

Szilvassy S, Meyerrose T, Grimes B. Effects of cell cycle activation on the short-term engraftment properties of ex vivo expanded murine hematopoietic cells. *Blood* 2000;95:2829-2837.

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

Telen M, Kaufman R. The mature erythrocyte. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:193-227.

Temeles D, McGrath H, Kittler E, Shadduck R, Kister V, Crittenden R, Turner B, Quesenberry P. Cytokine expression from bone marrow derived macrophages. *Exp Hematol* 1993;21:388-393.

Tepper R, Coffman R, Leder P. An Eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of Interleukin-4. *Science* 1992;257:548-551.

Teschemacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived atypical opioid peptides and related compounds with opioid antagonist activity. En: Brantl V, Teschemacher H, editores. β -casomorphins and related peptides: *Recent developments*. UCH Germany, 1994: 3-17.

Teschemacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 1997;43:99-117.

Valledor A, Borrás F, Cullell-Young M, Celada A. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 1998;63:405-417.

Valtieri M, Tweardy D, Caracciolo D, Johnson K, Mavilio F, Altmann S, Santoli D, Rovera G. Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol* 1987;138:3829-3835.

Verdi R, Barbano M. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. *J Dairy Sci* 1991;74:2077-2081.

Verfallie C, Hurley R, Bathia R. Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994;16:201-216.

- Walstra P and Jenneis R. Dairy chemistry and physics. John Wiley Sons, New York, 1984.
- Weinberg J. Mononuclear phagocytes. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G, editores. Wintrobe's Clinical Hematology. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:377-414.
- Weissman I. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-168.
- Weissman I, Anderson D, Gage F. Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.
- Whetton A, Spooner E. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:721-726.
- Wickremasinghe R, Hoffbrand V. Molecular basis of leukemia and lymphoma. En: Provan D, Gribben J, editores. Molecular Haematology. Blackwell Science. Great Britain, 2000:25-41
- Wong C, Seow H, Liu A, Hunsbad A, Smithers G, Watson D. Modulation of immune responses by bovine β -casein. *Immunol Cell Biol* 1996;74:323-329.
- Yamada M, Suzu S, Tanaka-Douzono T, Wakimoto N, Hatake K, Hayasawa H, Motoyoshi K. Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stroma-initiating cells. *J Cell Physiol* 2000;184:351-355
- Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers* 1997;43:129-134.
- Yvon M, Pélissier J, Guilloteau P, Toullec R. Digestion des protéines du lait dans la caillette du veau préruminant. *Reprod Nutr Dévelop* 1986;26:705-715.
- Zandstra P, Lauffenburger D, Eaves C. A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: A biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. *Blood* 2000;96:1215-1222.
- Zhang Y, Willson T, Metcalf D, Cary D, Hilton D, Clark R, Nicola N. The Box-1 region of the Leukemia inhibitory factor receptor α -chain cytoplasmic domain is sufficient for hemopoietic cell proliferation and differentiation. *J Biological Chem* 1998;273:34370-34383.
- Zucht H, Raida M, Adermann K, Margert H, Forssmann W. Casocidin-I: a casein alpha-S2-derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters* 1995;372:185-188.

12. PUBLICACIONES

El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D

Gerardo Ramos,* Edelmiro Santiago,* Ignacio Martínez,* Isaac Zambrano,* Beatriz Manrique,* Benny Weiss*

* Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM. México, D.F.

Sodium caseinate induces differentiation of the multipotential hemopoietic cell line 32D

ABSTRACT

Aim. To determine the role of sodium caseinate (CasNa) in the modulation of hemopoiesis. **Materials and methods.** 32D cells, a murine hemopoietic multipotential cell line dependent on interleukin-3 (IL-3) for proliferation and survival, were used. These cells were cultured with 0.5 ng/mL of IL-3, together with different concentrations of CasNa. We evaluated: proliferation (direct counting under the microscope and use of thymidine ³H), morphological differentiation (Giemsa staining), cytochemistry (specific staining for monocytes and granulocytes), and function (presence of Fc receptors and reduction of nitro-blue tetrazolium). In addition, we determined cell viability through trypan blue exclusion and apoptosis using the TUNEL assay in situ. **Results.** We showed that CasNa induced a decrease in cell proliferation, which is dose dependent, and is neither a result of a diminished cell viability, nor due to an increase in cell death through apoptosis. In addition, CasNa induces cell differentiation towards the monocytic lineage. **Conclusions.** CasNa has the capacity to differentiate 32D cells towards the monocytic lineage, and, importantly, has a potent differentiating activity on 32D cells being able to promote differentiation in a shorter time than the well known factors G-CSF and GM-CSF.

Key words. Sodium caseinate. Myeloid. Hemopoiesis. Differentiation. Monocyte-macrophage.

INTRODUCCIÓN

La hematopoyesis es controlada por un grupo de citoquinas conocidas como factores de crecimiento hematopoyético e interleucinas,^{1,2} 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, miembro de la familia de las hormonas esteroideas.^{3,4}

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la participación del caseinato de sodio (CasNa) en la modulación de la hematopoyesis. **Material y métodos.** Se emplearon células 32D, una línea celular hematopoyética multipotencial, de origen murino y dependiente de interleucina-3. Estas células se cultivaron con 0.5 ng/mL de interleucina-3 y con concentraciones variables de CasNa. En los cultivos se realizaron estudios de proliferación celular (conteo directo e incorporación de timidina ³H) y de diferenciación morfológica (tinción con Giemsa), citoquímica (tinciones específicas para monocitos-macrófagos y para granulocitos) y funcional (presencia de receptores Fc y reducción de nitro azul de tetrazolio), además se determinó la viabilidad con azul de tripano y la apoptosis por la reacción TUNEL in situ. **Resultados.** Se demostró que el CasNa produce una reducción en la proliferación, dependiente de la dosis, que ésta no es provocada por una disminución de la viabilidad de las células 32D así como tampoco por un aumento de la muerte celular por apoptosis. Además el CasNa indujo la diferenciación de las células 32D hacia monocito-macrófagos en cultivos de 4 días. **Conclusiones.** Aparentemente el CasNa ejerce una actividad tipo factor estimulador de colonias de macrófagos. Además, parece ser un potente factor de diferenciación de las células 32D, ya que en sólo 4 días de estímulo genera células de tipo monocito-macrófago, a diferencia de los 7 días requeridos por la combinación de G-CSF y GM-CSF.

Palabras clave. Caseinato de sodio. Hematopoyesis. Diferenciación. Monocito-macrófago.

Aunque no existen evidencias directas de la participación de la caseína (la proteína más abundante de la leche) en la hematopoyesis, algunos datos indican que puede activar a los leucocitos ya que la caseína o su sal, el caseinato de sodio (CasNa), inyectada vía intraperitoneal en ratones o peces, inducen una respuesta inflamatoria, promoviendo inicialmente la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal.^{5,6} Adicionalmente, se ha reportado un

incremento de la concentración de citocinas tipo factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y de granulocitos (G-CSF), tanto en el suero como en el fluido de la cavidad peritoneal de ratones inyectados con CasNa.⁷ Por otro lado, nuestro grupo ha proporcionado evidencias de que la inyección de CasNa a la cavidad peritoneal de ratón, favorece la acumulación de granulocito-neutrófilos y de macrófagos, aunque sólo induce la producción de M-CSF en los granulocitos, un factor que promueve la monocitopoyesis.⁸ Este conjunto de datos sugiere que el CasNa tiene la capacidad para inducir la liberación de citocinas.

Además, los cultivos de neutrófilos en banda provenientes de la médula ósea de ratón en presencia de CasNa, presentan una transición acelerada hacia una morfología polimorfonuclear o segmentada,⁹ una característica de los granulocito-neutrófilos completamente maduros.¹⁰

El hecho de que los neutrófilos en banda responden al estímulo con CasNa, a pesar de no estar completamente diferenciados, abre la posibilidad de que otros precursores mieloides más primitivos también sean blanco de esta molécula, lo cual permite considerar la posibilidad de abrir un nuevo campo de estudio *in vitro* e *in vivo* sobre la modulación de la hematopoyesis, donde las proteínas de la leche, un producto alimenticio, pueden tener gran relevancia inmuno-hematológica. Por lo anterior, en el presente trabajo se estudia el efecto del CasNa sobre la proliferación y diferenciación de las células 32D de ratón, una línea hematopoyética multipotencial dependiente de IL-3 y ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis normal.¹¹

MATERIAL Y MÉTODOS

Línea celular. La línea mieloide multipotencial 32D dependiente de IL-3,¹¹ gentilmente donada por la Dra. T. Hoang (Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, Montreal, Quebec, Canadá), se cultivó en una atmósfera al 5% de CO₂ y 37°C, en medio Iscove's Modified Dulbecco's (Gibco BRL USA), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB, Gibco BRL USA) previamente inactivado a 56°C y 0.5 ng/mL de rmIL-3 (R&D System, Minneapolis, MN). El cultivo fue mantenido con una densidad inicial de 1x10⁵ células/mL y resembrado en cajas Petri (Fisher Brand, Denmark) a las 48 horas al llegar a 1x10⁶ células/mL. La concentración de rmIL-3 empleada en este trabajo fue obtenida después de realizar una curva dosis respuesta de la proliferación con las células 32D.

Tratamiento de las células 32D con CasNa. Las células 32D se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunclon, Denmark), a una densidad

inicial de 2x10⁴ células/mL y 0.5 ng/mL de rmIL-3 y en presencia de 2 mg/mL de CasNa por 1, 2, 3, 4 y 5 días o durante 4 días con 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg/mL de CasNa, a menos que se indique de otra manera. El CasNa (Difco Laboratories, USA) se disolvió en PBS al 10% w/v y se esterilizó por autoclave. En los ensayos se incluyeron como controles, cultivos con PBS a una concentración final del 2%.

Evaluación de la proliferación celular. Número celular. Después de transcurrido el tiempo indicado para cada ensayo, los cultivos celulares fueron resuspendidos y una alícuota se colocó en un hemocitómetro para evaluar el número celular bajo un microscopio de luz (Carl Zeiss) y posterior cálculo de la densidad celular.

Incorporación de timidina tritiada. La cuantificación de la incorporación de timidina tritiada fue otro parámetro usado para evaluar la proliferación celular. Al segundo día de cultivo de las células 32D (2x10⁴ células/mL) en presencia o ausencia de 0.5, 1, 2 y 3 mg/mL de CasNa y 0.5 ng/mL de rmIL-3, se adicionó 1 µCi/mL de ³H-timidina (Amersham, actividad 185 mbq), 24 horas después fueron cosechadas, lavadas con PBS y lisadas con NaOH (0.4 M). Finalmente se añadieron 2 mL de líquido de centelleo (Beckman, USA) y se hizo la lectura en un contador de emisiones beta (Beckman LS6500).¹²

Viabilidad celular. Necrosis. Para determinar la existencia de muerte por necrosis en las células 32D tratadas con CasNa, se empleó el método de incorporación del colorante azul tripano (Sigma Co. USA). Una muestra de las células cultivadas se mezcló en una proporción 1:1 con el colorante, se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente, se colocó en un hemocitómetro y se contaron 200 células para calcular el porcentaje de células muertas (teñidas por el colorante) y vivas.

Apoptosis. Para evaluar la muerte por apoptosis, las células 32D, a una densidad de 1.5 x 10⁵ células/mL, se cultivaron por 48 horas en presencia o ausencia de 0.5 ng/mL de rmIL-3 y 2 mg/mL de CasNa. El botón celular fue lavado con una solución de BSA (albúmina bovina) al 1% en PBS (solución PBA) y fijado con formaldehído al 3%. La apoptosis se evaluó por reacción Tunel *in situ*,¹³ y el porcentaje de células apoptóticas se calculó empleando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BH-2).

Diferenciación Celular: Diferenciación morfológica. La diferenciación morfológica se evaluó después de realizar un frotis y teñirlo con el colorante Giemsa (Sigma Co. USA), diferenciando los blastos de los linajes monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo por su tamaño, forma del núcleo y la proporción núcleo-citoplasma.^{14,15}

Tinción citoquímica. Para identificar con mayor precisión los linajes celulares, se realizaron técnicas de tinción citoquímica específicas para el linaje monocito-macrófago (alfa-naftil acetato esterasa) y para el granulocito-neutrófilo (cloroacetato esterasa).¹⁶

Reducción de NBT. La diferenciación funcional se evaluó mediante la reducción del NBT (nitro azul de tretazolio) por los aniones superóxido, que indica la capacidad microbicida de monocitos y neutrófilos, un parámetro usado para evaluar la diferenciación funcional de células fagocíticas.¹⁷ Brevemente, se preparó una solución con 1000 μ L de NBT 1.2 mM por cada μ L de TPA (miristato ácido de forbol) 324 μ M, adicionando suero fetal bovino al 10%. Esta solución se añadió al cultivo en proporción 1:1 agitando suavemente e incubando 30 min. a 37°C. La evaluación de las células que redujeron al NBT se realizó en un microscopio invertido para placas (Sedival).

Presencia de receptores Fc. La expresión de receptores Fc para la IgG se determinó mediante el ensayo de rosetas con eritrocitos activados (EA). Las células fueron lavadas con PBS e incubadas por 30 min. a 37°C con 180 μ L de RPMI y 20 μ L de eritrocitos de carnero opsonizados con anticuerpos anti-eritrocitos de carnero (Sigma Co. USA). Posteriormente, las células fueron resuspendidas suavemente y se colocaron en un hemocitómetro y se contó el número de rosetas formadas. Células con tres o más eritrocitos adheridos se consideraron positivas.¹⁸

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y cuando menos tres veces de manera independiente, los resultados se expresaron como media y su desviación estándar. En los ensayos de viabilidad, apoptosis y diferenciación (morfológicos, citoquímicos y funcionales) se contaron al menos 200 células por preparación.

RESULTADOS

Para evaluar el afecto del CasNa en la cinética de proliferación de las células 32D, se emplearon estas células con o sin 2 mg/mL de CasNa, dosis que induce la diferenciación de neutrófilos en banda.⁹ En este ensayo se demostró que a pesar de la presencia de la rmIL-3, el CasNa redujo la proliferación celular desde los 2 días de cultivo, aunque fue más evidente a los 3, 4 y 5 días con un decremento de hasta un 50% en comparación con la proliferación obtenida con la adición de sólo rmIL-3 (Figura 1). Los cultivos no mostraron proliferación en ausencia de rmIL-3 con o sin CasNa (datos no mostrados).

Para determinar si la reducción de la proliferación de las células 32D era dosis dependiente, se realizó una curva dosis-respuesta con CasNa. La evaluación

del número celular después de 4 días de cultivo mostró que con 0.5 mg/mL de CasNa ya existían indicios de inhibición, sin embargo, se requirió 1 mg/mL o más para obtener un abatimiento en la proliferación de aproximadamente el 50% (Figura 2a).

La reducción de la proliferación inducida por el CasNa, se confirmó mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada, usando las dosis (0.5, 1, 2 y 3 mg/mL) de CasNa que mostraron signos de abatimiento de la proliferación celular. Los datos muestran que estas dosis redujeron la proliferación en aproximadamente un 60% (Figura 2b).

Con el propósito de establecer si la reducción en la proliferación provocada por el CasNa es consecuencia de una disminución de la viabilidad celular, las células 32D se cultivaron durante 4 días con diferentes dosis de CasNa. Por medio de la técnica de exclusión de azul tripano, se encontró que la viabilidad celular fue de aproximadamente el 90%, independientemente de la concentración (0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg/mL) de CasNa. También se observó un 90% de viabilidad celular al emplear 2 mg/mL de CasNa durante 1, 2, 3 y 4 días de cultivo.

Al evaluar la apoptosis en las células 32D cultivadas por 2 días con sólo 0.5 ng/mL de rmIL3 o en combinación con 2 mg/mL de CasNa, en ambos casos se encontró un 2 ± 0.5 y 3 ± 0 % de muerte por apoptosis respectivamente, a diferencia del 100% encontrado en los cultivos en ausencia de rmIL-3 con o sin CasNa.

Para determinar si la caída de la multiplicación celular promovida por el CasNa, era consecuencia de una inducción a la diferenciación morfológica, la tinción de las células 32D cultivadas durante 4 días en presencia de diferentes dosis de CasNa, mostró que

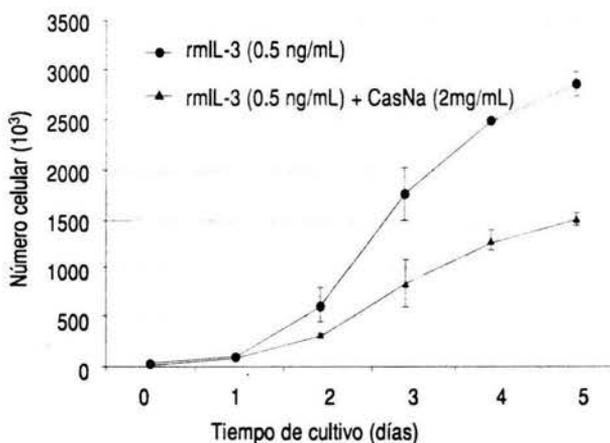


Figura 1. Proliferación de las células 32D en presencia de 2 mg/mL de CasNa a diferentes tiempos de cultivo. rmIL-3 = interleucina-3 recombinante de ratón. CasNa = caseinato de sodio.

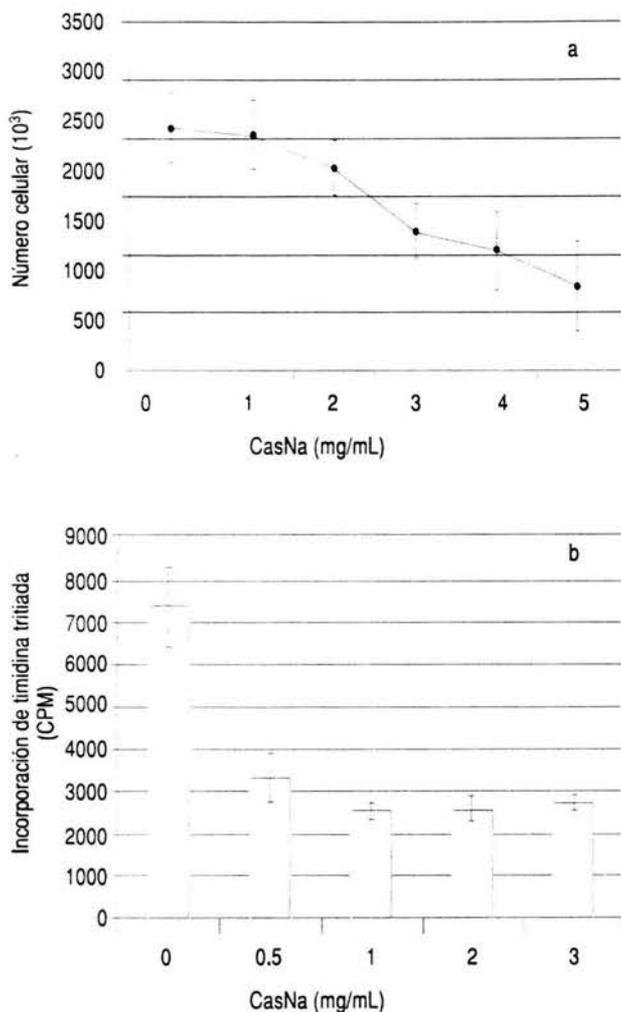


Figura 2. Proliferación de las células 32D con diferentes dosis de CasNa. a) Evaluación del número celular a los 4 días de cultivo. b) Incorporación de timidina tritiada después de 3 días de cultivo.

con 1.0 mg/mL ya existen evidencias de diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago, alcanzando un 39 y 49% con dosis de 2 y 3 mg/mL respectivamente, mientras que no se encontraron indicios de diferenciación hacia el linaje granulocítico (Cuadro 1).

Al emplear la técnica de tinción citoquímica específica para monocitos o granulocitos, en las células cultivadas por 4 días con diferentes dosis de CasNa, se encontró que efectivamente sólo se está favoreciendo la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago, mostrando un efecto similar en la evaluación morfológica (Cuadro 1 y Figura 3).

Para estudiar si el caseinato de sodio, además de la diferenciación morfológica y citoquímica, también induce características de diferenciación funcional en las

células 32D, se evaluó la producción de radicales de oxígeno (anión superóxido) mediante la reducción del NBT. Los datos indican que las células 32D mostraron una débil pero consistente capacidad para reducir NBT en forma dosis dependiente del CasNa (Cuadro 1).

La cuantificación de otro parámetro de diferenciación funcional, la expresión de receptores Fc, evaluada de acuerdo al porcentaje de la población celular capaz de formar rosetas EA, indicó que el CasNa induce la expresión del receptor Fc en forma dosis dependiente, alcanzando un máximo de 64% de formación de rosetas con una dosis de 3 mg/mL (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Está documentado que las citocinas, hormonas y neuropéptidos modulan la hematopoyesis.^{19,20} Los datos presentados en este trabajo dan evidencias de la participación del CasNa, una sal de las proteínas de la leche (caseínas), como otro modulador de la hematopoyesis ya que la adición del mismo disminuyó la proliferación e indujo la diferenciación de las células 32D hacia el linaje monocito-macrófago, así como la expresión de receptores Fc y producción de radicales libres (reducción de NBT). Teniendo en mente que este es el primer estudio que evalúa el efecto del CasNa en la hematopoyesis y el resultado indica bloqueo de la proliferación mieloide, existe la posibilidad de que tal respuesta sea un reflejo del efecto tóxico del CasNa. Sin embargo, este no es el caso ya que encontramos alta viabilidad celular y sin evidencias de muerte por necrosis o apoptosis. Además, la reducción de la proliferación no es consecuencia de la posible presencia de lipopolisacárido un producto bacteriano que puede inhibir la hematopoyesis,²¹ ya que la adición de altas dosis no afectó la proliferación de las células 32D (datos no mostrados).

Por el contrario, la disminución de la proliferación, generación de células del linaje monocito-macrófago, inducción a la expresión de receptores Fc y reducción de NBT en las células 32D después de su exposición al CasNa, indica que esta biomolécula promueve una diferenciación mieloide. Particularmente porque la diferenciación de células precursoras hematopoyéticas incluye una reducción de la proliferación y transición de células blásticas hacia formas maduras, acompañada de la producción de lisozima, radicales libres, expresión de receptores de superficie celular tales como los receptores Fc e inmunofagocitosis.^{10,22,23}

El CasNa parece ser un potente diferenciador de las células 32D hacia el linaje monocito-macrófago, sobre todo si consideramos que requiere un estímulo de tan sólo 4 días, en comparación de los 7 días de cultivo en presencia de G-CSF más GM-CSF para obtener el mis-

Cuadro 1. Inducción a la diferenciación de las células 32D tratadas con diferentes dosis de CasNa. Porcentaje de monocito-macrófagos y granulocito-neutrófilos después de la tinción con giemsa y citoquímica específica (alfa-naftil acetato esterasa para macrófagos y cloroacetato esterasa para neutrófilos). Porcentaje de células reductoras de NBT (nitro azul de tetrazolio) y células formadoras de rosetas EA (eritrocitos activados). ND = no determinado.

Caseinato de sodio (CasNa)	Diferenciación morfológica (%)		Tinción citoquímica específica (%)		Expresión de receptores Fc	Producción del anión superóxido
	mg/mL	Monocito-macrófago	Granulocito-neutrófilo	Monocito-macrófago	Granulocito-neutrófilo	Formación de rosetas EA (%)
0	0.5 ± 0.7	5.3 ± 1.5	3.8 ± 0.7	11 ± 1.5	10 ± 1.5	0 ± 0
0.1	2.8 ± 2.5	4.7 ± 4.2	N.D.	N.D.	14.3 ± 0.6	N.D.
0.5	4.3 ± 1.8	0.7 ± 1.2	11 ± 1.8	5 ± 1.2	23.7 ± 3.3	1.4 ± 1.0
1.0	12.5 ± 4.9	0.3 ± 0.6	29 ± 4.9	6 ± 0.6	46 ± 6.9	2.7 ± 0.1
2.0	39.3 ± 8.8	0 ± 0	35.3 ± 8.8	6 ± 0	54 ± 4.3	4.5 ± 0.4
3.0	48.8 ± 11	0 ± 0	N.D	N.D	64.8 ± 7.0	4.3 ± 0.1

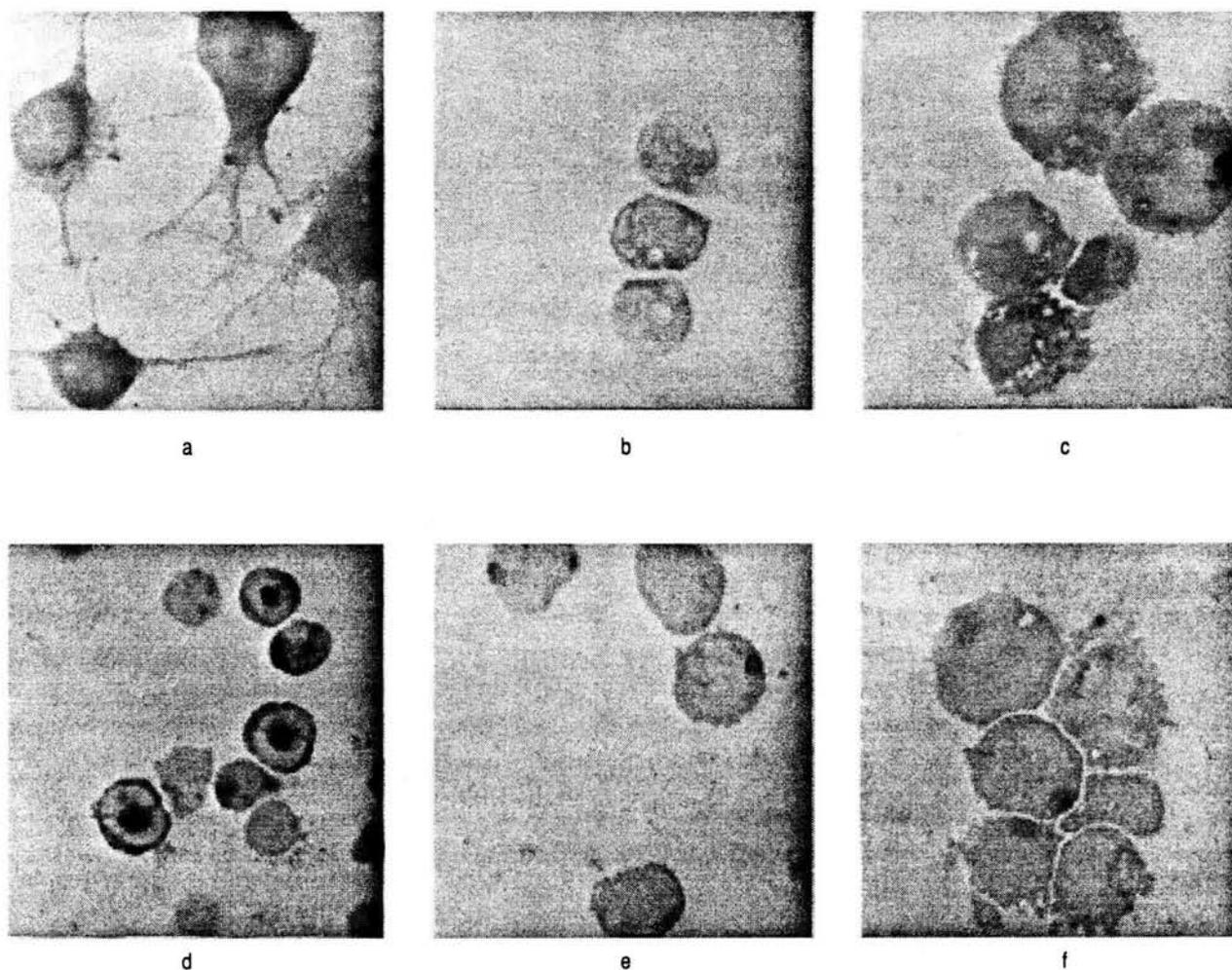


Figura 3. Tinción citoquímica específica con alfa-naftil acetato esterasa para el linaje monocito-macrófago (a, b, c) y cloroacetato esterasa para granulocito-neutrófilos (d, e, f). Línea macrófaga P388 y células de médula ósea de ratón como control positivo para el linaje macrófago (a) y granulocito-neutrófilo (d) respectivamente. Células 32D cultivadas con rml-3 y suero fetal bovino (b, e). Células 32D cultivadas con rml-3, suero fetal bovino y CasNa (c, f).

mo resultado.²⁴ La diferenciación de células 32D hacia monocito-macrófagos bajo el efecto del G-CSF y GM-CSF se da gracias a la inducción a la expresión del receptor de GM-CSF promovido por el G-CSF.²⁴ Desconocemos si el CasNa induce la expresión de alguna citocina y su receptor en las células 32D, de manera que favorezca su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago. Uno de los candidatos para mediar este efecto es el M-CSF, no sólo porque las células 32D se diferencian hacia monocito-macrófagos, sino porque hemos mostrado que el CasNa induce la producción de M-CSF en los granulocitos.⁹ Sin embargo, aunque no se descarta la posibilidad de que las células 32D tratadas con CasNa produzcan M-CSF o su receptor, existen datos que indican que el M-CSF no afecta la proliferación y diferenciación de las células 32D, probablemente por la ausencia de receptores para M-CSF en esta línea celular.²⁴ Otro candidato es el GM-CSF, sin embargo, debido a que este requiere hasta 7 días de exposición para observar el mismo efecto inducido por el CasNa en tan sólo 4 días de cultivo, es poco probable que este factor sea el responsable de la diferenciación.

Una probable ruta de activación de las células 32D mediada por el CasNa es a través de los receptores opioides. El caseinato de sodio se obtiene disolviendo α -caseína, β -caseína y κ -caseína en hidróxido de sodio y evaporando posteriormente,²⁵ lo que implica que el CasNa tiene sales de β -caseína. Se ha reportado que la β -caseína y algunos péptidos liberados durante su degradación, conocidos como casomorfina, favorecen la fagocitosis en células mononucleadas.^{26,27} Es ya conocido que las casomorfina ejercen su actividad biológica uniéndose a los receptores opioides.²⁸ Además, existen evidencias de la presencia de receptores opioides en células precursoras mieloides.²⁹ Por lo anterior, la posibilidad de que la ruta de activación del caseinato de sodio sea a través de los receptores opioides parece ser una primera opción a evaluar.

Independientemente de la ruta de activación, es evidente el efecto biológico del CasNa sobre las células mieloides multipotenciales, el cual es similar al de un factor de crecimiento hematopoyético. La propiedad del CasNa para inducir la generación de células del linaje monocito-macrófagos, así como la inducción a la expresión de receptores Fc y producción de radicales libres, semeja la actividad del M-CSF, una citocina específica del linaje monocito-macrófago, la cual promueve un limitado número de divisiones celulares, y fuerte diferenciación hacia el linaje macrofágico.²

Las características de diferenciación inducidas en las células 32D por el CasNa son relevantes en el contexto inmunológico. Particularmente porque los monocito-macrófagos son las principales células

efectoras del sistema inmune, mientras que los receptores Fc constituyen el puente de comunicación entre la respuesta inmune específica y las células efectoras, vía unión de complejos antígeno-anticuerpo a los receptores Fc. La unión de los complejos inmunes a los receptores Fc desencadena la inmunofagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, producción de radicales libres, e incluso producción de citocinas.³⁰ Todas estas respuestas se consideran como una de las principales líneas de defensa del organismo ante infecciones por patógenos o en la eliminación de células propias transformadas.³⁰

Aunque se ha publicado que la caseína y el caseinato de sodio inducen quimiotaxis en leucocitos *in vivo*,^{5,6,31} la β -caseína coestimula la producción de anticuerpos, incremento de la capacidad de los granulocitos para reducir al NBT, inducción²⁷ o inhibición de la proliferación de linfocitos,³² además el CasNa induce la liberación *in vivo* de citocinas tipo M-CSF y G-CSF⁷ y de M-CSF *in vitro*.⁹ Este es el primer trabajo que demuestra que el CasNa induce la diferenciación morfológica y funcional a partir de precursores hematopoyéticos multipotenciales, lo cual resalta la posible importancia biológica de los compuestos de la familia de las caseínas en la respuesta inmune y modulación de la hematopoyesis. Por lo anterior, este estudio realizado *in vitro* sugiere una nueva alternativa en la modulación de la hematopoyesis, a base de proteínas de la leche que puede sumarse a la mediada por citocinas, hormonas y neuropéptidos.

La fuerte capacidad del CasNa para inducir diferenciación mieloides lo hace un candidato propicio para evaluar su efecto en células hematopoyéticas malignas. Así, no sólo conoceremos su papel en los procesos básicos de diferenciación, sino que también puede abrir opciones para investigar un posible uso terapéutico en enfermedades oncológicas e infecciosas.

Por otro lado, se ha demostrado que durante la digestión intestinal de la caseína y del caseinato de sodio, se liberan péptidos biológicamente activos,^{28,33} entre ellos las casomorfina, los cuales llegan al torrente sanguíneo y se unen a los receptores opioides, incluyendo a los expresados en los linfocitos.^{33,34} Es fundamental demostrar que el caseinato de sodio modula la hematopoyesis vía receptores opioides, ya que de confirmarse podría tener gran impacto en el sector salud, sobre todo porque la población de más escasos recursos sufren de desnutrición y alta frecuencia de enfermedades infecciosas, por lo tanto una dieta básica suplementada con caseinato de sodio (ampliamente usado en la industria alimenticia), contribuiría al suministro de proteína de alto valor nutricional y al mismo tiempo existe la posibilidad de que pudiera promover el fortalecimiento de la respuesta inmune.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos el apoyo recibido del programa de DGAPA No IN213397 y IN215199 y de la FES-Zaragoza. Gerardo Ramos tiene beca de la DGAPA y del CONACYT. Ignacio Martínez tiene el apoyo de fundación UNAM. Se agradece el apoyo técnico del Sr. Ranulfo Pedraza.

REFERENCIAS

1. Sachs L. The control of hematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4742-9.
2. Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol* 1999; 27: 1113-23.
3. Dawson M, Elstner E, Kizaki M, Chen D, Pakkala S, Kerner B et al. Myeloid differentiation mediated through retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RXR) not RXR/RXR pathway. *Blood* 1994; 84: 446-52.
4. Grande A, Manfredini R, Tagliafico E, Balestri R, Pizzanelli M, Papa S et al. All-trans-retinoic acid induces simultaneously granulocytic differentiation and expression of inflammatory cytokines in HL-60 cells. *Exp Hematol* 1995; 23: 117-25.
5. Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G. The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1993; 2: 71-81.
6. Aranishi F, Hara K, Osatomi K, Ishihara T. Cathepsins B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comp Biochem Physiol* 1997; 117: 605-11.
7. Lotem J, 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.
8. Santiago E, Mora L, Montesinos J, Ventura J, Machuca C, Mendoza J et al. Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblasts. *Rev Invest Clin* 1994; Suplemento 1: 253.
9. 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.
10. Glasser L, Flederman R. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 1987; 69: 937-44.
11. Greenberger J, Sakakeeny M, Humphries R, Eaves C, Eckner R. Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2931-5.
12. Zentella A, Weis FMB, Ralph DA, Lahio M, Massague J. Early responses to TGF- β in cells lacking growth suppressive RB function. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4952-8.
13. Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of surface antigens and apoptosis. *Trends Genet* 1994; 10: 41-2.
14. Johnston RB, Zucker-Franklin D. *The mononuclear phagocyte system*. In: Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM, editors. Atlas of blood cells. 2nd. ed. Italy: Ermes, 1988: 323-352.
15. Marmont AM, Damasio E, Zucker-Franklin D. *Neutrophils*. In: Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM, editors. Atlas of blood cells. 2nd. Ed. Italy: Ermes, 1988: 159-188.
16. Li C, Lam K, Yam L. Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1973; 21: 1-12.
17. Breitman T. Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL-60. *Method Enzymol* 1990; 190: 118-30.
18. Bianco CP, Nussenzweig V. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization. *J Exp Med* 1970; 132: 702-12.
19. Mountford J, Bunce C, Hughes S, Drayson M, Webb D, Brown G et al. Estrone potentiates myeloid cell differentiation: a role for 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in modulating hemopoiesis. *Exp Hematol* 1999; 27: 451-60.
20. Broome C, Whetton A, Miyan J. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production is mediated by both direct effects on CFU-GM. *Br J Haematol* 2000; 108: 140-50.
21. Ayroldi E, Blasi E, Varesio L, Wiltrot R. Inhibition of proliferation of retrovirus-immortalized macrophages by LPS and IFN-gamma: Possible autocrine down-regulation of cell growth by induction of IL1 and TNF. *Biotherapy* 1992; 4: 267-76.
22. Ruhl S, Pluznik DH. Dissociation of early and late markers of murine myeloid differentiation by interferon-gamma and interleukin-6. *J Cell Physiol* 1993; 155: 130-6.
23. Isoda H, Shinmoto H, Kitamoto D, Matsumura MN. Differentiation of human promyelocytic cell line HL-60 by microbial extracellular glycolipids. *Lipids* 1997; 32: 263-71.
24. Kreider B, Phillips P, Prystowsky M, Shirsat N, Pierce J, Tushinski R et al. Induction of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor by granulocyte CSF increases the differentiative options of a murine hematopoietic progenitor cell. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4846-53.
25. Walstra P, Jenneis R. *Dairy chemistry and physics*. John Wiley Sons, New York, 1984.
26. Berthou J, Migliore-Samourd D, Lifchitz A, Delette J, Floc'h F, Jolles P. Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. *FEBS Letters* 1987; 218: 55-8.
27. Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune response by bovine β -casein. *Immunol Cell Biol* 1996; 74: 323-9.
28. Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 1997; 43: 119-28.
29. Hagi K, Inaba K, Sakuta H, Muramatsu S. Enhancement of murine bone marrow macrophage differentiation by β -Endorphin. *Blood* 1995; 86: 1316-21.
30. Flores F, Santiago E, Weiss SB. Receptores Fc γ en salud y enfermedad. *Rev Invest Clin* 1998; 50: 529-40.
31. Metcalf D. The molecular control of granulocytes and macrophages. *Ciba Foud Symp* 1997; 204: 40-50.
32. Otani H, Monnai M, Hosono A. Bovine k-casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft* 1992; 47: 512-5.
33. Ledoux N, Mahe S, Duarry M, Bourras M, Benamouzin R, Tome D. Intraluminal immunoreactive caseinomacropptide after milk protein ingestion in humans. *Nahrung* 1999; 43: 196-200.
34. Elitsur Y, Luk G. Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 493-7.

Reimpresos:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer (L-324), FES-Zaragoza. Batalla 5 de Mayo S/N, esquina Fuerte de Loreto, Ejército de Oriente, Iztapalapa, C.P. 09230, México, D.F.
Tel/Fax: 5-773-4108, edelmiro@servidor.unam.mx

Recibido el 03 de enero de 2000.

Aceptado el 28 de junio de 2000.

ORIGINAL ARTICLE

Sodium Caseinate Induces Expression and Secretion of Murine Multipotent Myeloid Cell Line 32D Macrophage Colony-Stimulating Factor

Gerardo Ramos, Benny Weiss, Yolanda Córdova, Jorge Hernández,
Isaac Zambrano and Edelmiro Santiago

Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer (L-324), Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC),
Facultad de Estudios Superiores Iztapalapa, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Received for publication April 11, 2003; accepted October 20, 2003 (03/056).

Background. Evidence that sodium caseinate (CasNa) is capable of inhibiting proliferation of hematopoietic precursor cell line 32D and inducing its differentiation into macrophage cells has recently been published. Taking into consideration that hematopoiesis is regulated by growth factors and that macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) is a well-known growth factor that induces differentiation of macrophages, in this work we evaluated whether CasNa is capable of inducing expression and secretion of M-CSF in 32D cells.

Methods. We cultured 32D cells in presence and absence of CasNa and compared their proliferation and viability. RNA was extracted from cell lysates to evaluate expression of the gene for M-CSF and its receptor. Cultured conditioned media was used to evaluate presence of M-CSF.

Results. Our results showed that CasNa inhibited proliferation of 32D cells and that conditioned media (CM) of these cultures contained M-CSF-like activity. Presence of M-CSF in CM was detected by inhibiting M-CSF activity with anti-M-CSF and presence of this growth factor was confirmed by ELISA assay. We also provided evidence that CasNa induced expression of mRNA for M-CSF in 32D cells as well as increased expression of mRNA for its receptor.

Conclusions. CasNa inhibits proliferation of 32D cells and induces expression of the gene for M-CSF and that of its receptor. It also induces secretion of the bioactive form of M-CSF. © 2004 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Sodium caseinate, M-CSF, Proliferation, Multipotent hematopoietic cell line.

Introduction

When sodium caseinate (CasNa) or casein was injected intraperitoneally (i.p.) into mice, it produced an inflammatory reaction that induced massive migration of mature leukocytes into the cavity (1,2). Due to its effect on the depleting bone marrow of its reserve of mature leukocytes, this model was also used to study normal recovery of the bone marrow myeloid cell compartment (3). Several hematopoietic growth factors were detected in peritoneal cavity and serum of CasNa- or casein-treated mice (1,3). Casein is an important

element in the human diet and several studies hinted at its relevance in normal hematopoietic functions (4,5) as well as its influence in immunologic response in animal models (6). We recently showed that CasNa could induce *in vitro* differentiation of primitive hematopoietic 32D cells into functional mature macrophages (7). Macrophages participated in elimination of foreign bodies, especially pathogen microorganisms, and cooperated with lymphocytes in modulating immune response (8). Taking into consideration that macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) is a well-known growth molecule capable of inducing differentiation of hematopoietic precursors into functionally mature macrophages (9), in this work we measured possible induction of M-CSF expression and secretion in 32D cells by CasNa. Our results showed that CasNa was indeed capable of inducing secretion of M-CSF on 32D cells as well as expression of

Address reprint requests to: Dr. Edelmiro Santiago Osorio, Laboratorio L-324, FES-Zaragoza Campus II, UNAM, Calle Batalla 5 de Mayo s/n, E. Oriente, Iztapalapa, 09230 México, D.F., México. Phone and fax: (+52) (55) 5773-4108; E-mail: edelmiros@yahoo.com

mRNA for this growth factor. We also found that CasNa upregulated expression of mRNA for the receptor for M-CSF on these cells.

Materials and Methods

Cytokines and antibodies. Recombinant mouse interleukin 3 (rmIL-3), recombinant mouse macrophage colony-stimulating factor (rmM-CSF), and anti-rmM-CSF purified goat IgG were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), while rabbit anti-goat IgG-HRP conjugate was purchased from Zymed Laboratories, Inc. (San Francisco, CA, USA.)

Cell culture. Mouse IL-3 dependent myeloid cell line 32D (10) was a gift kindly provided by T. Hoang (Hemopoiesis and Leukemia Laboratory, Montreal, Quebec, Canada). Cells were cultured in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C in Iscove Modified Dulbecco medium (IMDM, Gibco BRL, Detroit, MI, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, UT, USA) and 0.5 ng/mL of rmIL-3.

Twenty thousand 32D cells were cultured with or without sodium caseinate (CasNa) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) in 96-well plates (Costar, Cambridge, MA, USA). Conditioned media (CM) collected on different days were stored at -70°C until used.

Colony-forming assay. To obtain bone marrow cells (BMCs) from female mouse strain CD1, IMDM was flushed through individual mouse femoral shafts using a syringe. Cells from marrow were pooled and washed three times by centrifugation in IMDM medium and then resuspended in 2 mL of IMDM containing 10% (v/v) of FBS.

For colony-forming assay, the double agar layer technique was employed (11). Briefly, a first layer with 0.6% (w/v) agar containing IMDM medium, 20% (v/v) horse serum (HS) and either 20 ng/mL rmM-CSF or 20% (v/v) of each CM to be tested was layered; a second layer with 0.3% (w/v) agar, IMDM medium, and 10% HS (v/v) was overlaid with 10⁵ BMCs per well. After 7 days of incubation, all colonies with >20 cells were counted using an inverted microscope.

Evaluation of the morphology of colonies in the double-layer agar assay was performed by modification of a transfer technique on coverslips (12). Briefly, the upper agar layer was cut into approximately 2.5- × 1-cm pieces and a sheet of dry Whatman No. 2 filter paper (Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA) of the same size was overlaid. As soon as the filter became moist, it was carefully removed. Attached colonies were transferred by placing the filter on a coverslip for 45 min at room temperature: the filter paper was then carefully removed. Colonies on the coverslip were fixed and stained with Giemsa.

When colonies consisted of small cells with ring-shaped nuclei or when nuclei were segmented, they were scored as mature granulocytic colonies; when cells were large in size and large vacuoles were evident, they were scored as macrophages and colonies with undifferentiated cells were scored as blastic. Finally, to confirm morphology specific cytochemistry, stains with α -naphthyl acetate esterase for monocyte-macrophages and chloroacetate esterase for granulocyte-neutrophils were used (13,14).

Inhibition of colony-forming activity. To inhibit colony-forming activity in agar assay, we added an anti-rmM-CSF monoclonal antibody (1:200 dilution) in first agar layer with BMCs. We also used rmM-CSF (20 ng/mL) in presence or absence of antibody as control.

ELISA assay. Presence of M-CSF in supernatants from cultures of 32D treated with CasNa was measured using an ELISA assay. Briefly, 100 μ L/well of each CM was added to immunoplates (Corning, Westbury, NY, USA). After incubation for 2 h at 37°C followed by 4°C overnight, wells were washed with 0.1% (v/v) polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20) in PBS (Tween/PBS) and blocked by adding 200 μ L/well of 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS-Tween (BSA/PBS solution) for 3 h at 37°C. BSA/PBS was discarded and wells were washed with Tween/PBS. We then added 100 μ L/well of primary antibody (goat-anti-rmM-CSF diluted 1:500 in PBS/BSA) for 3 h at 37°C. After washing with BSA/PBS, secondary antibody (rabbit anti-goat IgG HRP conjugate diluted 1:500 in PBS/BSA) was added and incubated for 3 h at 37°C and wells were washed with BSA/PBS. Finally, o-phenylenediamine was added and dissolved in 0.5 mg/mL in citrate buffer (pH 5) and O₂H₂ (1%). Plates were read at 490 nm in a plate reader (Tecan Spectra, Grödig/Salzburg, Austria).

RT-PCR mRNA assay for M-CSF and M-CSF receptor. We analyzed 32D cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for mRNA expression of M-CSF and M-CSF receptor. For this purpose, total RNA was isolated with TRIZOL (Trizol reagent, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Briefly, 32D cells (1 × 10⁶) were cultivated in presence or absence of 2 mg/mL CasNa. Cells were then washed with PBS and 1 mL of TRIZOL and 200 μ L of chloroform was added. Aqueous phase was collected and mixed with isopropyl alcohol and RNA thus precipitated was placed in 15 μ L of H₂O DEPC (H₂O treated with diethyl pyrocarbonate). Subsequently, RNA (1 μ g) was reverse-transcribed (RT) with 500 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase according to manufacturer instructions (Perkin Elmer, GeneAmp RNA PCR N808-0017, Norwalk, CT, USA). RT was achieved during 60 min at 42°C and 10 min at 90°C. Resulting complementary DNA (cDNA) was amplified by standard PCR (105 sec at 95°C, 35 cycles of 15 sec at 95°C, and 30 sec at 60°C, 7 min at 72°C) in a thermal cycler (Techne model

FGEN05TP, Techne, Inc., Princeton, NJ, USA). PCR products were subsequently visualized by agarose gel electrophoresis (2%) containing ethidium bromide and RT-PCR was normalized for β -actin.

Primers used in PCR for M-CSF were 5'-TCG ACA TGG CTG GGC TCC C-3' and 5'-ATC AGG CTT GGT CAC CAC ATC-3', while for M-CSF receptor they were 5'-TTG TAC CGA GCT TGA AGA CCC-3' and 5'-AGC CTT GAG ACT GAG AGC CC-3'; these primers amplified a 527 pb fragment and 552 pb fragment, respectively (15), and for β -actin 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3' and 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' were used: these primers amplified a 238 pb fragment. RT-PCR for M-CSFR products were quantified by Collage 3.8 Image software (Harland, WI, USA) and were normalized by β -actin. All biochemicals were from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, unless otherwise specified.

Results

Conditioned media (CM) from 32D cells cultured in presence of CasNa possess M-CSF-like activity. To determine whether proliferation of 32D cells was inhibited by CasNa, these cells were cultured in presence of CasNa for 0, 1, 2, 3, and 4 days. Our results showed that indeed CasNa inhibited proliferation of these hematopoietic cells (Figure 1).

To evaluate whether conditioned media (CM) of 32D cells cultured in presence of CasNa had colony-forming activity, colony-formation assay with bone marrow cells was performed. Our results showed that 3- and 4-day CM presented colony-forming activity (Figure 2), such as that for rmM-CSF (36 ± 7.5 colonies).

To determine cell type of these colonies, they were stained with Giemsa; stained cells presented macrophage morphology. Positive stain with macrophage-specific alpha-naphthyl acetate esterase confirmed that in fact they were macrophage colonies (Figure 3); a similar percentage (92 ± 5 macrophages and 8 ± 2 granulocyte-neutrophil) was obtained from colonies induced by rmM-CSF.

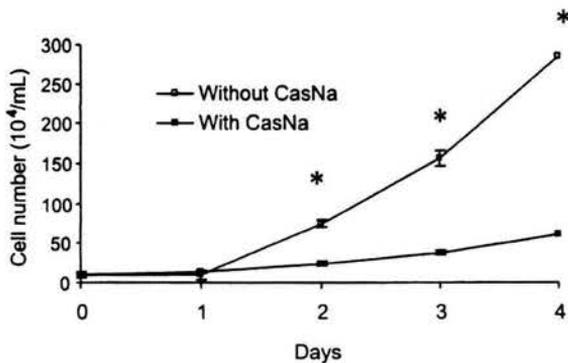


Figure 1. Number of 32D cells after 0, 1, 2, 3, and 4 days in culture with (—■—) or without (—□—) 2 mg/mL of CasNa in presence of 0.5 ng/mL of rmIL-3. Data represent mean \pm SD of three independent experiments and difference (*) was significant at $p < 0.05$ by Student *t* test.

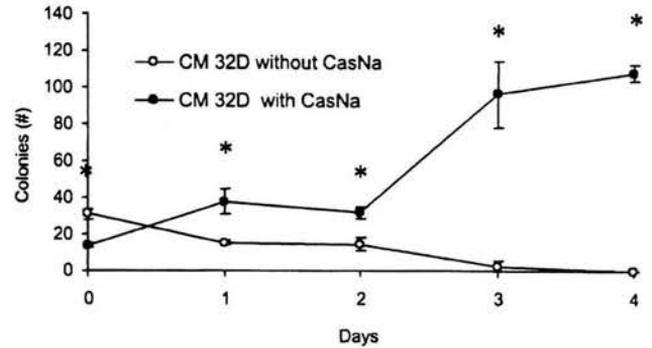


Figure 2. Number of colonies induced by conditioned media (CM) of 32D cell cultures after 0, 1, 2, 3, and 4 days with 0.5 ng/mL of rmIL-3 in absence (—○—) and presence (—●—) of 2 mg/mL of CasNa. Bone marrow agar cultures were kept for 7 days. Data represent mean \pm SD of three independent experiments and difference (*) was significant at $p < 0.05$ by Student *t* test.

CasNa induced production of M-CSF by 32D cells. Taking into consideration that M-CSF is the known growth factor for production of macrophage colonies in bone marrow cells, we evaluated whether colony-forming activity in CM from 32D cells cultured in presence of CasNa contained M-CSF. For this purpose, colony-formation activity of CM was evaluated in presence of anti-M-CSF. Our results showed that anti-M-CSF was capable to inhibit colony formation (93%) of bone marrow cells cultured in CM (Figure 4), thus hinting that M-CSF was the main colony-stimulating factor produced by 32D cells cultured in presence of CasNa. We confirmed presence of M-CSF by ELISA assay (Figure 5).

CasNa-induced expression of the gene for M-CSF and for its receptor on 32D cells. Once we determined that CasNa induced secretion of M-CSF on 32D cells, we evaluated whether it could also induce gene expression of this growth factor. For this purpose, mRNA was extracted from these cells after their culture for 36, 48 and 60 h in presence of

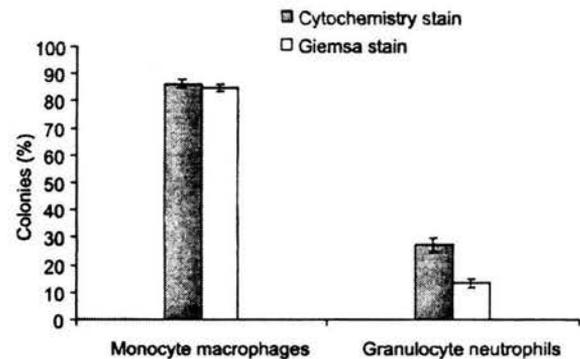


Figure 3. Percentage of granulocytic and macrophagic colonies in 7-day bone marrow cultures induced by CM of 32D cells after 4 days in culture with 2 mg/mL of CasNa in presence of 0.5 ng/mL of rmIL-3. White bars represent morphologic evaluation of Giemsa-stained colonies and colored bars represent colonies that were stained with alpha naphthyl acetate esterase specific for macrophages and chloroacetate esterase specific for granulocytes. Data represent mean \pm SD of three independent experiments.

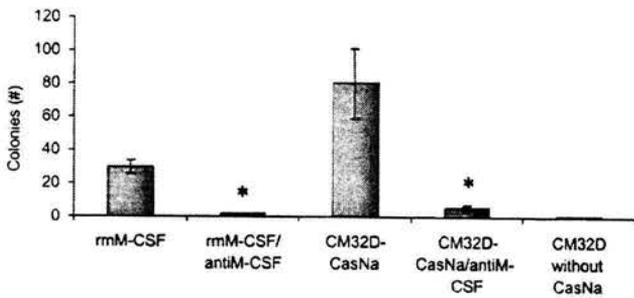
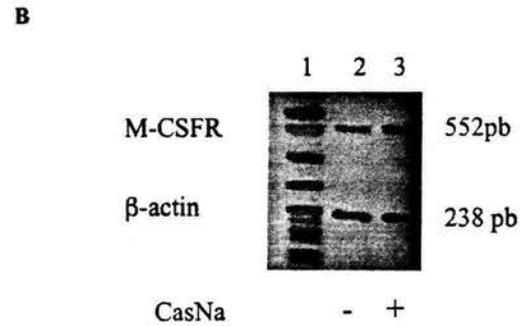
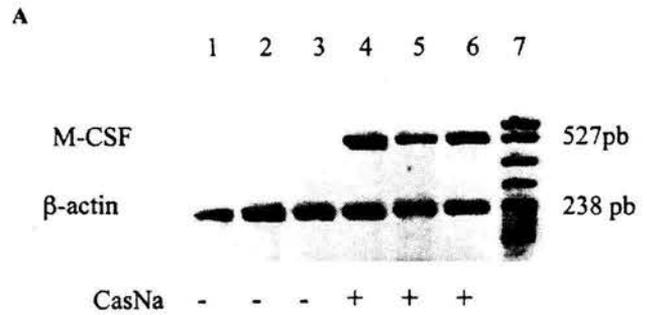


Figure 4. Number of bone marrow colonies induced by CM of 32D cells cultured for 4 days with 0.5 ng/mL of rmlL-3 in presence of 2 mg/mL of CasNa with or without anti-M-CSF (1:200 dilution). Number of colonies induced with 20 ng/mL of M-CSF in presence or absence of anti-M-CSF was evaluated as positive control. Agar cultures were kept for 7 days. Data represent mean \pm SD of three independent experiments and difference (*) was significant at $p < 0.05$ by Student *t* test.



CasNa. We detected by RT-PCR presence of mRNA for M-CSF in cells cultured with CasNa (Figure 6A). We also detected presence of mRNA for the receptor for M-CSF in cells cultured in absence of CasNa; however, we observed that expression of this molecule increased more than twofold when cells were cultured with CasNa (Figure 6B).

Discussion

We recently demonstrated that sodium caseinate (CasNa) inhibited proliferation of multipotent hematopoietic cell line 32D and induced its differentiation into macrophages (7). In this work, we provided evidence that CasNa also induced M-CSF gene expression as the main colony-stimulating factor in 32D cells.

Taking into consideration that M-CSF by itself was unable to induce differentiation of 32D cells (16), the fact that CasNa induced M-CSFR mRNA expression by 32D cells, a receptor not normally present in these cells (16), was important to explain the possible reason why 32D cells treated with CasNa were induced for differentiation, although it

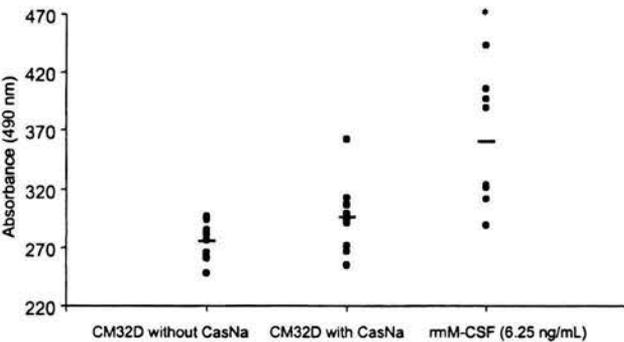


Figure 5. ELISA assay for M-CSF contained in CM of 32D cells cultured with 0.5 ng/mL of rmlL-3 for 4 days with 2 mg/mL of CasNa. Absorbance was evaluated at 490 nM. Data represent mean \pm SD of four independent experiments and difference (*) was significant at $p < 0.05$ by Student *t* test.

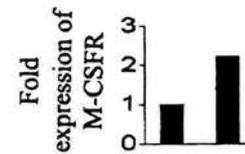


Figure 6. A) RT-PCR for M-CSF mRNA of 32D cells cultured for 36, 48, and 60 h with 0.5 ng/mL of rmlL-3 in presence (channels 4, 5, and 6) or absence (channels 1, 2, and 3) of 2 mg/mL of CasNa. β -actin was used as cellular control and in channel 7, a control with known molecular weights was added; B) RT-PCR and image analysis for receptor for M-CSF (M-CSFR) mRNA of 32D cells cultured for 24 h with 0.5 ng/mL of rmlL-3 in presence (channel 3) and absence (channel 2) of 2 mg/mL of CasNa. β -actin was used as cellular control and in channel 1, a control with known molecular weights was added.

would be interesting to evaluate whether induced expression of this mRNA by CasNa was capable to induce membrane expression of this M-CSF receptor.

It was also known that digestion of casein produced polypeptides with strong biological activity (17); thus, it would be interesting to evaluate whether there was a polypeptide derived from casein that was responsible for production of growth factor M-CSF and differentiation of immature cells into macrophages, as observed in this work.

It was published that casein induced other cytokines such as IL-1 from macrophages (6), thus hinting that casein through secondary production of physiologically relevant cytokines could also participate in modulation of immune response. Interestingly, mice inoculated with casein increased their natural immune response (18) and rats fed with casein reduced their risk to develop tumors in digestive tract (19).

In this work, we provided evidence that sodium caseinate can induce differentiation properties in a myeloid cell line that the normal macrophagic differentiator M-CSF cannot, such as expression of the receptor for M-CSF and inhibition of growth. In consequence, it would be interesting to identify casein-induced cytokines that differentiated 32D cells and evaluate whether they can also differentiate leukemic cells, thus opening up the study of useful anti-leukemic cytokines.

Acknowledgments

We thank Mr. Ranulfo Pedraza-Garnelo for excellent technical assistance.

This work was supported in part by PAPIIT IN215199 and IN203501 grants from the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

References

1. Lotem J, 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.
2. Fierer J, Swancutt MA, Heumann D, Golenbock D. The role of lipopolysaccharide binding protein in resistance to *Salmonella* infection in mice. *J Immunol* 2002;168:6396-6403.
3. Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S, Rago LD. 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.
4. Aschkenasy A. Influence of certain antimetabolites (aminopterin, 6-mercaptopurine, prednisolone, and chloramphenicol) on the restoration of lymphopoiesis after an experimental nitrogen inanition. *C R Seances Soc Biol Fil* 1968;19:652-657.
5. Okano M, Ohnata 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;122:1376-1383.
6. Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune responses by bovine beta-casein. *Immunol Cell Biol* 1996;74:323-329.
7. Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. Sodium caseinate differentiation of the multipotential hematopoietic 32D cell line. *Rev Invest Clin* 2000;52:638-644.
8. Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 2002;72:621-627.
9. Suzu S, Motoyoshi K. Signal transduction in macrophages: negative regulation for macrophage colony-stimulating factor receptor signaling. *Int J Hematol* 2002;76:1-5.
10. Greenberger J, Sakakeeny M, Humphries R, Eaves C, Eckner R. Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *PNAS* 1983;80:2931-2935.
11. Pluznick DH, Sachs L. The induction of clones of normal "mast" cells by a substance from conditioned medium. *Exp Cell Res* 1966;43:553-563.
12. Moezzi J, Ali-Osman F, Murphy MJ. Rapid method for permanent slide preparation of colonies in soft agar cultures. *Int J Cell Cloning* 1986;20:368-374.
13. Li C, Lam K, Yam L. Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1973;21:1-12.
14. Markovic OT, Young DS, Markovic NS. Quinidine-induced inhibition of leukocyte esterases. *Clin Chem* 1988;34:518-524.
15. Raivich G, Haas S, Werner A, Klein MA, Kloss C, Kreutzberg GW. Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *J Comp Neurol* 1998;395:342-358.
16. Adachi M, Roussel MF, Havenith K, Sherr CJ. Features of macrophage differentiation induced by p19INK4d, a specific inhibitor of cyclin D-dependent kinases. *Blood* 1997;90:126-137.
17. Clare D, Swaisgood E. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci* 2000;83:1187-1195.
18. Noursadeghi M, Bickerstaff MC, 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.
19. Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Taniguchi H. Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in Wistar rats fed a low-protein diet. *Int J Cancer* 1992;50:108-111.

4. Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Immunol Rev* 2001; 1:69–75.
5. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347(12):911–920.
6. Bell J. New family ties to asthma. *Nature Immunol Rev* 2002;2:5.
7. Leibowitz U, Antonovsky A, Medalic JM, Smith HA, Halpern L, Alter M. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1966;29:60–68.
8. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J* 1989;299:1259–1260.
9. Johnston SL, Openshaw PJM. The protective effect of childhood infections. *Br Med J* 2001;322:376–377.
10. Lynch NR, Hagel I, Pérez M, Di Prisco MC, López R, Alvarez N. Effect of antihelminthic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:404–411.
11. van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodríguez LC, Lell B, Peelder AM, Kremsher PG. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000;356:1723–1727.
12. Skadhauge LR, Christensen K, Kyvik KO, Sigsgaard T. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. *Eur Respir J* 1999;13:8–14.
13. von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:9–19.
14. Prescott SL, Macaubas C, Smallcombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PJ. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999;353:196–200.
15. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, Von Mutius E, and the Allergy Endotoxin Study Team. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school age-children. *N Engl J Med* 2002;347(12):869–877.
16. Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chione P, Stroppolini T, Pasquini P, D'Amelio R. Cross-sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *Br Med J* 1997;314:999–1003.
17. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275:77–79.
18. Aaby P, Shaheen SO, Heyes CB, Goudiaby A, Hall AJ, Shiell AW, Jensen H, Marchant A. Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. *Clin Exp Allergy* 2000;30:644–650.
19. Alm JS, Lija G, Pershagen G, Scheynius A. Early BCG vaccination and development of atopy. *Lancet* 1997;350:400–403.
20. Bottcher MF, Nordin EK, Sandin A, Midtvedt T, Bjorksten B. Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1590–1596.
21. Wickens K, Pearce N, Crane J, Beasley R. Antibiotic use in early childhood and the development of asthma. *Clin Exp Allergy* 1999;29: 766–771.
22. Ball TM, Castro-Rodríguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martínez FD, Wright A. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000;8:538–543.
23. Christiansen SC. Day care, siblings, and asthma—please, sneeze on my child. *N Engl J Med* 2000;343(8):574–575.
24. Olson JK, Croxford JL, Miller SD. Virus-induced autoimmunity, potential role of viruses in initiation, perpetuation, and progression of T-cell-mediated autoimmune disease. *Viral Immunol* 2001;14:227–250.
25. Forastiere F, Agabiti N, Corbo GM, Dell'Orco V, Porta D, Pistelli R, Levinstein S, Perrucci CA. Socioeconomic status, number of siblings, and respiratory infections in early life as determinants of atopy in children. *Epidemiology* 1997;8:566–570.
26. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1958–1962.
27. Offit P, Hackett CJ. Addressing parents' concerns: do vaccines cause allergic or autoimmune diseases? *Pediatrics* 2003;111(3):653–659.
28. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri P. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076–1079.
29. Qin HY, Sadelain MW, Hitchon C, Lauzon J, Singh B. Complete Freund's adjuvant induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1993;150:2072–2080.
30. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kenemy DM. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium-vaccae*-induced allergen-specific regulatory T cells. *Nat Med* 2002;8:625–629.
31. Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nature Med* 2003;9(7):831–835.



ELSEVIER

Archives of Medical Research 35 (2004) 262

**Archives
of Medical
Research**

ERRATUM

The following is the correct title for the article by Gerardo Ramos et al. in #2, 2004 of the journal: Sodium Caseinate Induces the Murine Multipotent Myeloid Cell Line 32D to Express and Secrete Macrophage Colony Stimulating Factor. *Archives of Medical Research* regrets the changes in the title as published: Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. Sodium Caseinate Induces Expression and Secretion of Murine Multipotent Myeloid Cell Line 32D Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Arch Med Res* 2004;35(2):109–113.