



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

## **POSGRADO EN CIENCIAS**

### **BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

Estudio de la participación del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en la inhibición de la proliferación de la línea celular mieloide normal 32D y la línea leucémica WEHI-3 de ratón tratadas con alfa, beta y kappa caseína.

# **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

**P R E S E N T A**

**YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**

**MÉXICO, D.F.**

**NOVIEMBRE, 2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

**El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer, ahora Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM; para su realización se contó con el apoyo del Programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro de becaria 194078.**

**Esta investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio y la supervisión del comité tutorial integrado por la Dra. María Isabel Soto García y la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, misma que fue apoyada por los proyectos PAPIIT IN214903, IN214903-2, IN217407 de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA), UNAM.**

---

---

*A MIS PADRES*

*OTRA VEZ A MIS PADRES*

*A MIS HERMANAS, DESDE LAS PEQUEÑAS A LAS GRANDES*

*A MIS SOBRINOS*

*A MIS AMIGAS Y AMIGOS*

---

---

## **AGRADECIMIENTOS:**

**A los miembros de mi jurado por sus oportunas y atinadas correcciones al presente trabajo: Dra. María de Lourdes Mora García, Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, Dr. Edelmiro Santiago Osorio, Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta, Dra. Leticia Moreno Fierros, gracias.**

**Al Dr. Benny Weiss Steider por su ayuda con el inglés, al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, por su tiempo y paciencia.**

**A mis compañeros y alumnos por su paciencia.**

**A todo el apoyo de mi familia, que sin su ayuda no habría logrado este trabajo.**

**A mis adorados sobrinos y ahijada, aunque no los vea seguido, son mi fuente de energía, y receptores de mi más puro afecto.**

**Al apoyo incondicional de mi comadre y amigas, por siempre gracias, y gracias científicas pues ayudan a mi longevidad.**

Nombre de archivo: A1  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título:  
Asunto:  
Autor: Jouls  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:23 A.M.  
Cambio número: 2  
Guardado el: 14/11/07 02:50 A.M.  
Guardado por: Jouls  
Tiempo de edición: 3 minutos  
Impreso el: 02/01/01 04:27 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 4  
Número de palabras: 256 (aprox.)  
Número de caracteres: 1,464 (aprox.)

---

---

## INDICE.

ABREVIATURAS	7
RESUMEN.	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEORICO	
Las caseínas	12
Hematopoyesis	14
Factor de Necrosis Tumoral Alfa	19
Efectos Biológicos del TNF- $\alpha$	21
Modelos celulares	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
IV. JUSTIFICACIÓN	27
V. HIPÓTESIS	28
VI. OBJETIVO GENERAL	29
Objetivos específicos	29
VII. MATERIALES Y MÉTODO	
Líneas celulares	30
Citocinas recombinantes y anticuerpos	30
Evaluación de la proliferación	30
Evaluación de la viabilidad	31
Evaluación de la diferenciación	31
Producción de TNF- $\alpha$	32
Evaluación de la participación del TNF- $\alpha$	33
Manejo de Datos	33
VIII. RESULTADOS:	
OBJETIVO 1	35
OBJETIVO 2	42
OBJETIVO 3	43
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
X. CONCLUSIONES.	50
XI. PERSPECTIVAS .	51
XII. BIBLIOGRAFÍA	52

Nombre de archivo: A2  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: INDICE  
Asunto:  
Autor: Jouls  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:25 A.M.  
Cambio número: 1  
Guardado el: 14/11/07 02:26 A.M.  
Guardado por: Jouls  
Tiempo de edición: 1 minuto  
Impreso el: 02/01/01 04:29 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 1  
Número de palabras: 138 (aprox.)  
Número de caracteres: 788 (aprox.)

---

---

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -caseína, a-cas	alfa caseína
$\beta$ -caseína, b-cas	beta caseína
$\kappa$ -caseína, k-cas	kappa caseína
CasNa	caseinato de sodio
anti-TNF- $\alpha$	anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa
ELISA	inmunoensayo acoplado a una enzima.
G-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos
SCF	factor de células tallo
IL-1 $\beta$	interleucina-1 beta
IL-3	interleucina-3
CFC-APP	células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo
EPO	eritropoyetina
TPO	trombopoyetina
LPS	lipopolisacárido
FCH	factores de crecimiento hematopoyético
CTH	célula tallo hematopoyética
CPL	células progenitoras comprometidas al linaje linfoide
CPM	células progenitoras comprometidas al linaje mieloide
PME	progenitores megacariocíticos-eritroides
PGM	progenitores de granulocito- macrófagos
AGM	aorta-gónada-mesonefro
NK	células natural killer o asesinas naturales
MC	medio condicionado
IgG	inmunoglobulina G
uL	microlitro
$\mu$ Ci	microcurie
ng	nanogramo
mL	mililitro
kDa	kilodalton

Nombre de archivo: A10  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: ABREVIATURAS  
Asunto:  
Autor: Jouis  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:39 A.M.  
Cambio número: 1  
Guardado el: 14/11/07 02:40 A.M.  
Guardado por: Jouis  
Tiempo de edición: 1 minuto  
Impreso el: 02/01/01 04:33 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 1  
Número de palabras: 160 (aprox.)  
Número de caracteres: 917 (aprox.)

---

---

## RESUMEN.

La hematopoyesis está regulada por factores de crecimiento hematopoyético (FCH) e interleucinas, todos miembros de la familia de citocinas. Sin embargo, existen otras biomoléculas distintas a las citocinas que también modulan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Recientemente hemos mostrado que tanto el caseinato de sodio (CasNa) y sus subunidades alfa, beta y kappa ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -) caseínas pueden inhibir la proliferación de la línea celular normal hematopoyética multipotencial 32D y de una línea leucémica de ratón WEHI-3. También hemos demostrado que el CasNa inhibe la proliferación de las células 32D vía la producción de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Sin embargo no conocemos si  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína comparten la misma vía.

En este trabajo se muestra que la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína suprimen la proliferación de las líneas celulares 32D y WEHI-3, sin afectar su viabilidad: Solo detectamos diferenciación hacia el linaje macrofágico en las células 32D. Por otro lado, a través de ensayos ELISA, demostramos que sólo  $\alpha$ -caseína induce la producción de TNF- $\alpha$  en la línea celular 32D mientras que no en WEHI-3. Encontramos que la inducción de la producción de TNF- $\alpha$  por  $\alpha$ -caseína es menor a la cantidad obtenida con CasNa.

Finalmente, demostramos que el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  neutralizó el efecto antiproliferativo de  $\alpha$ -caseína en la línea celular 32D. Así, nuestros datos evidencian que la  $\alpha$ -caseína puede inhibir la proliferación de la línea celular 32D vía inducción de la producción de TNF- $\alpha$ .

---

---

## ABSTRACT.

Hematopoiesis is regulated by growth factors (HGF) and interleukins, all member of the cytokine family. Nevertheless there are other biological molecules different to cytokines that can also regulate the proliferation and differentiation of hematopoietic cells. Recently we have shown that sodium caseinate (CasNa) and their subunits the alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) and kappa ( $\kappa$ )-caseins can also inhibit the proliferation of a mouse normal myeloid cell line (32D) and of a leukemic cell line (WEHI-3). We have also shown that CasNa inhibits the 32D cell proliferation via the production of the tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ). Nevertheless we do not know if the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\kappa$ -caseins are also able to share this same property.

In this work we show that the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\kappa$ -caseins suppress the proliferation of the 32D and WEHI-3 cell lines without affecting their viability. We detected differentiation toward the macrophage lineage in 32D cell. On the other hand, by ELISA assays, we demonstrated that only  $\alpha$ -casein induce TNF- $\alpha$  production in 32D cell line while not on WEHI-3. We found that the induction of TNF- $\alpha$  production by  $\alpha$ -casein is less than the one obtained with CasNa.

Finally we show that the antibody against TNF- $\alpha$  neutralizes the  $\alpha$ -casein antiproliferative effect in 32D cells. Thus our data point to the fact that the  $\alpha$ -casein can inhibit the 32D cell line proliferation via the induction of TNF- $\alpha$  production.

Nombre de archivo: A4  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: RESUMEN  
Asunto:  
Autor: Jouis  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:31 A.M.  
Cambio número: 1  
Guardado el: 14/11/07 02:31 A.M.  
Guardado por: Jouis  
Tiempo de edición: 1 minuto  
Impreso el: 02/01/01 04:31 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 2  
Número de palabras: 434 (aprox.)  
Número de caracteres: 2,476 (aprox.)

---

---

## **INTRODUCCIÓN.**

El sistema hematopoyético es uno de los mejores caracterizados, existe amplia información en cuanto a la biología de las células tallo y progenitoras, así como de las citocinas o factores de crecimiento hematopoyético (FCH) que regulan el proceso de hematopoyesis (Broxmeyer and Kin, 1999; Bruno et al 2004; Metcalf, 2007a y b). Sin embargo, además de las citocinas existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta a las citocinas que también modulan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Tales biomoléculas han sido poco estudiadas, pero se ha descubierto que pueden tener un gran impacto en la terapia de leucemias, de manera análoga al ácido retinoico (ATRA) en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (Fenaux et al, 2001); tal es el caso de la caseína, la principal proteína de la leche.

Durante más de dos décadas, la atención se ha centrado en analizar si las proteínas de la leche como caseína, alpha-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina y lactoferrina, tienen actividades biológicas adicionales a la nutrición (Lönnerdal, 2003).

A pesar de que no existen evidencias directas de la participación de la caseína en la hematopoyesis, desde hace algunos años se ha sugerido la participación de las proteínas de la leche en procesos hematopoyéticos. Así, ratones con una dieta privada de proteínas pero suplementada con caseína, muestran recuperación de sus células hematopoyéticas (Aschkenasy 1971), mientras que el consumo de caseína en ratones induce un aumento en los niveles de eritropoyetina determinando así la restauración de la eritropoyesis (Okano et al, 1991). Por otro lado, ratas alimentadas con caseína reducen el desarrollo de tumores de colon inducidos por azoximetano, se ha sugerido que tal disminución involucra al sistema inmune (Tatsuta et al, 1992). Asimismo, la caseína, como agente quimiotáctico favorece la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal de ratón induciendo así una respuesta inflamatoria (Pasotti et al, 1993).

---

---

Por otro lado, 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 (Lotem et al, 1985). Por otro lado nuestro grupo de laboratorio ha proporcionado evidencias de que la inyección de CasNa a la cavidad peritoneal de ratón favorece la acumulación de granulocitos-neutrófilos y de macrófagos, aunque sólo induce la producción de M-CSF en los granulocitos, un factor que promueve la hematopoyesis (Santiago, 1994). Este conjunto de datos sugiere que el CasNa tiene la capacidad para inducir la liberación de citocinas.

Otros datos de nuestro grupo de trabajo mostraron que el caseinato de sodio (CasNa) también modula la hematopoyesis. Así, la adición de CasNa al cultivo de células 32D, una línea dependiente de interleucina-3 (IL-3) y ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis “normal”, redujo la multiplicación celular en forma dosis-dependiente, a pesar de la presencia de IL-3, además indujo su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago (Ramos et al, 2000), aunado a la inducción de la expresión del gen del M-CSF y su receptor c-fms (Ramos et al, 2004). De igual manera se demostró que los tres tipos de caseínas de la leche (alpha, beta y kappa caseina), frenan la proliferación de las células hematopoyéticas normal 32D y leucémicas de ratón WEHI-3 (Ramos et al, 2004), además en las células 32D inducen la expresión del gen de M-CSF, c-fms, del receptor de GM-CSF pero no del ligando GM-CSF, y en las células WEHI-3 inducen la expresión del receptor de GM-CSF (Melo, 2004).

Datos no publicados de nuestro grupo de investigación indican que las células 32D tratadas con CasNa producen TNF- $\alpha$ , el cual es en parte responsable de inhibir la proliferación de estas células, lo cual abre la posibilidad de que la inhibición de la proliferación mediada por las caseínas pueda ser consecuencia de la inducción a la producción de citocinas inhibitorias que controlen los procesos hematopoyéticos.

Nombre de archivo: A3  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: I  
Asunto:  
Autor: Jouls  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:26 A.M.  
Cambio número: 4  
Guardado el: 14/11/07 02:51 A.M.  
Guardado por: Jouls  
Tiempo de edición: 3 minutos  
Impreso el: 02/01/01 04:30 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 2  
Número de palabras: 603 (aprox.)  
Número de caracteres: 3,440 (aprox.)

---

---

## MARCO TEÓRICO.

### LAS CASEÍNAS.

Desde siempre la leche ha sido considerada como alimento, en particular para recién nacidos; las proteínas de la leche han sido estudiadas en principio bajo el aspecto de donadoras de aminoácidos (Koletzko et al, 1998), siendo la leche de vaca la mas frecuentemente consumida (Kon 1977).

La leche bovina está constituida por 3.38% de proteínas, 3.75% de grasas, 5% de carbohidratos, menos del 1% de vitaminas y minerales y 87% de agua. De la fracción proteica compuesta principalmente por  $\alpha$ -lactalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina y caseínas, esta última es el principal componente con el 80% de la fracción. Es conocido que la caseína se encuentra en forma de micelas, constituidas por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  caseína. Además al diluir la caseína en un álcali se obtienen caseinatos (Pérez y Pérez, 1984; Walstra & Jenners, 1984).

Habitualmente se dice que las caseínas son aquellas fosfoproteínas que se precipitan de la leche descremada por acidificación a pH 4.6 a 20°C (Pérez y Pérez, 1984). La  $\alpha$ -caseína constituye el principal componente de la micela de caseína, contiene de ocho a nueve grupos fosfato y presenta propiedades distintas al resto de las caseínas ( $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína). Es comúnmente aceptado que la  $\alpha$ S1-caseína constituye el armazón de la micela debido a que no presenta altas interacciones dependientes de la temperatura (Farell 1998). El modelo de  $\alpha$ S1-caseína muestra dos dominios, uno hidrofóbico y otro hidrofílico, conectados por un segmento de estructura hélice-alfa. El dominio hidrofóbico de la  $\alpha$ S1-caseína, (como se ha propuesto también para la  $\kappa$ -caseína) contiene además dos grupos de betas-plegadas antiparalelas, donde un grupo es aproximadamente del doble de tamaño que el otro. Se ha teorizado que tales estructuras beta, otorgan cierto grado de especificidad a la asociación hidrofóbica de las  $\alpha$ S1-caseínas, así como en la interacción entre  $\alpha$ S1-caseína y  $\kappa$ -caseína (Kumosinski et al, 1991a).

---

---

La  $\beta$ -caseína representa el 36% de la caseína de bovino total (Davis & Law 1980) y ejerce una variedad de propiedades funcionales que en la mayor parte de los casos difiere del resto de las caseínas ( $\alpha$ S1-caseína y  $\kappa$ -caseína). La molécula de  $\beta$ -caseína es una sola cadena con cinco residuos de serina fosforilados. Debido a su frecuencia de carga, hidrofobicidad y carga neta se ha sugerido puede ser una molécula lineal anfifílica, donde la porción amino-terminal (residuos 1 a 40) contiene las serinas fosforiladas y transporta esencialmente toda la carga neta de la proteína así como la mayoría de los residuos hélice-alfa potenciales, mientras que la región carboxilo terminal (residuos 136-209) contiene principalmente residuos apolares resultando en una alta hidrofobicidad. Por otro lado, se ha propuesto que dentro de la estructura de  $\beta$ -caseína, existen únicamente dos cadenas betas-plegadas estrechas (Creamer et al, 1981).

La estructura tridimensional teorizada para la  $\kappa$ -caseína, muestra dos grupos de betas-plegadas antiparalelas de casi igual longitud, cada grupo conteniendo un residuo de prolina en un giro-gamma como punto de referencia para la generación de las beta-plegada antiparalelas. A diferencia del resto de las caseínas,  $\kappa$ -caseína es soluble sobre un amplio rango de concentraciones de iones de calcio (Rose et al, 1985), en este sentido, tanto  $\alpha$ S1-caseína como  $\beta$ -caseína son insolubles a temperatura ambiente (24°C) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a una concentración de calcio total por debajo de aquella reportada para la leche, sin embargo, la precipitación de  $\beta$ -caseína en solución es temperatura dependiente, siendo el complejo de  $\beta$ -caseinato de calcio soluble a 1°C a concentraciones superiores a los 400 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . De esta manera, se ha propuesto que la fracción de  $\kappa$ -caseína otorga estabilidad a la micela de caseína, actúa como una pieza clave dentro de la micela estabilizando a las caseínas insolubles en calcio ( $\alpha$ S1-caseína y  $\beta$ -caseína) (Kumosinski et al, 1991).

---

---

## HEMATOPOYESIS.

El sistema hematopoyético representa una continuidad de las células con propiedades y fenotipo cambiantes según progresan a partir de células tallo hasta llegar a células diferenciadas (Coulombel 2004). Una célula tallo según Metcalf (Metcalf, 2007a), es aquella célula tallo hematopoyética que es capaz de auto-regenerarse y de ser multipotencial, y así, ser capaz de formar células maduras de los diferentes linajes hematopoyéticos. Las células tallo hematopoyéticas (CTH) se dividen para formar más CTH (auto regeneración) o para formar células progenitoras comprometidas al linaje linfoide (CPL) o células progenitoras comprometidas al linaje mieloide (CPM) (Ver Figura 1a). Las CPM son blastos grandes que pueden formar progenitores megacariocíticos-eritroides (PME), encargados de formar la progenie megacariocítica y eritroide. Las CPM pueden formar también progenitores de granulocito- macrófagos (PGM), que originan progenitores de granulocitos, macrófagos, y eosinófilos, y a partir de estos originan poblaciones maduras (Metcalf, 2007a). Los progenitores de células cebadas parten de las poblaciones CPM pero no pasan por el estadio de PGM (Chen et al, 2005).

Las CTH se concentran principalmente en el estroma de la médula ósea, se caracterizan por su alta capacidad proliferativa y de auto-renovación (Ogawa & Matsunaga, 1999; Orlic & Bodine, 1994), así como por la ausencia de características morfológicas o histoquímicas, propias de las células maduras o comprometidas hacia algún linaje celular. Estas células son consideradas totipotenciales, dado que son susceptibles de comprometerse hacia cualquiera de los linajes celulares sanguíneos mieloides y linfoides, cuando son estimuladas con la combinación de diferentes citocinas (Figura 1a) (Morrison et al, 1995; Ogawa 1993).

En el estroma las principales células que lo constituyen son llamadas células del estroma medular, entre estas se encuentran principalmente fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipocitos. La principal función de las células del estroma medular es promover las condiciones favorables para

---

---

la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, a través de la secreción de proteínas como la colágena, proteoglicanos y otras que constituyen la matriz extracelular, o bien secreción de proteínas llamadas citocinas que regulan la fisiología de las células hematopoyéticas y sus precursores (Munker et al, 1998; Prosper et al, 2001).

Al final de los procesos de proliferación y diferenciación, las células maduras hematopoyéticas formadas poseen múltiples funciones vitales para el organismo, por mencionar algunas; los eritrocitos transportan el oxígeno, las plaquetas participan en el control de la coagulación sanguínea, mientras que los granulocitos, monocitos y linfocitos intervienen en la defensa inmune contra agentes extraños (Zambrano-Ramírez et al, 1999).

En cuanto a la ontogenia de la hematopoyesis aún existe controversia; tradicionalmente se piensa que el saco vitelino es el sitio donde se originan las células tallo hematopoyéticas, y después migran al cuerpo al mismo tiempo que las células tallo primordiales y precursores melanoblásticos. Otra corriente de estudios realizados en quimeras de codorniz/gallina (Godin et al, 1995), afirman que el saco vitelino es sólo un lugar de paso y que la hematopoyesis persistente y definitiva, se origina a partir de las células de la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) alrededor de los vasos (Ver Figura 1b) (Godin et al, 1995).

El concepto tradicional sobre el origen de la hematopoyesis afirma que la misma ocurre durante un periodo estrictamente limitado después del cual no existe formación de novo de células hematopoyéticas, y como consecuencia la hematopoyesis finita es lógica ya que el saco vitelino desaparece. Por otro lado, si se demuestra una corriente de pensamiento reciente que indica que la región AGM es la fuente verdadera de las células tallo hematopoyéticas, entonces el inicio de la hematopoyesis puede no ser un proceso finito. Al respecto los investigadores solamente pueden concluir, que las poblaciones multipotenciales hematopoyéticas de células tallo existen, pero tienen una capacidad restringida de

---

---

auto-generación y que puede que no participe en la formación diaria de células; que las células comprometidas a un linaje existen con una multipotencialidad limitada y aunque tiene capacidad auto-generadora, tienen naturaleza restringida; y aparentemente algunas células maduras pueden tener capacidad auto-generadora (Metcalf, 2007b). Así, ambas teorías del origen de la hematopoyesis, aun están a discusión. Aunque las evidencias muestran que son estas células tallo/progenitoras adheridas a la aorta-gónadas mesonefros las únicas capaces de regenerar el sistema hematopoyético completo en ratones irradiados receptores, no así las células tallo hematopoyéticas de saco vitelino (Zhu & Emerson, 2002).

Experimentalmente se pueden reconocer a los diferentes tipos de células tallo y sus progenitores, así, se dice que las CTH y su progenie inmediata tiene que completar un alto número de divisiones (más de 15) en ensayos a largo plazo (más de 5 semanas) antes de que produzcan células diferenciadas, en contraste, las células progenitoras comprometidas con un linaje se diferenciarán en menos de 3 semanas y de 5 a 10 divisiones en ensayos a corto plazo. Además, se sabe bastante sobre las moléculas y mecanismos que regulan la proliferación y diferenciación de las células en ensayos a corto plazo y ya han sido estandarizados fácilmente, sin embargo no sucede lo mismo con los ensayos a largo plazo (Coulombel, 2004).

A mediados de los años sesenta se descubrió en cultivos in vitro, que las células precursoras hematopoyéticas provenientes de la médula ósea de ratón, solo proliferaban en presencia de células estromales o de medios condicionados (MC) de cultivos de células pertenecientes al estroma de médula ósea (Pluznik & Sachs 1965), estudios posteriores demostraron que la proliferación de estas células estaba sustentada por factores glicoprotéicos presente en el MC.

Los conocimientos generados sobre el control de la hematopoyesis indican que esta es regulada por una serie de glicoproteínas conocida como factores de crecimiento hematopoyético e interleucinas (Metcalf, 1998), las cuales son miembros de la familia de las citocinas. Estos moduladores ejercen su actividad

de manera autócrina, parácrina o endócrina, son capaces de regular la proliferación, la diferenciación y la activación de varios tipos celulares (Figura 1). Para las células progenitoras, la presencia de interleucina-3 (IL-3), factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF), de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina (EPO) o trombopoyetina (TPO), es suficiente para su proliferación y diferenciación hacia células maduras (Clark & Kamen 1987).

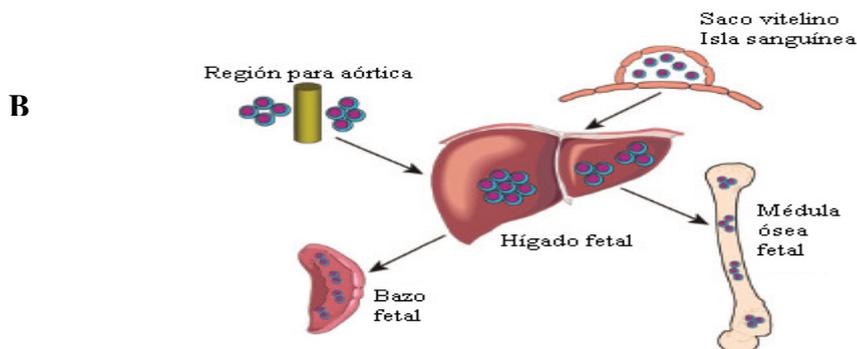
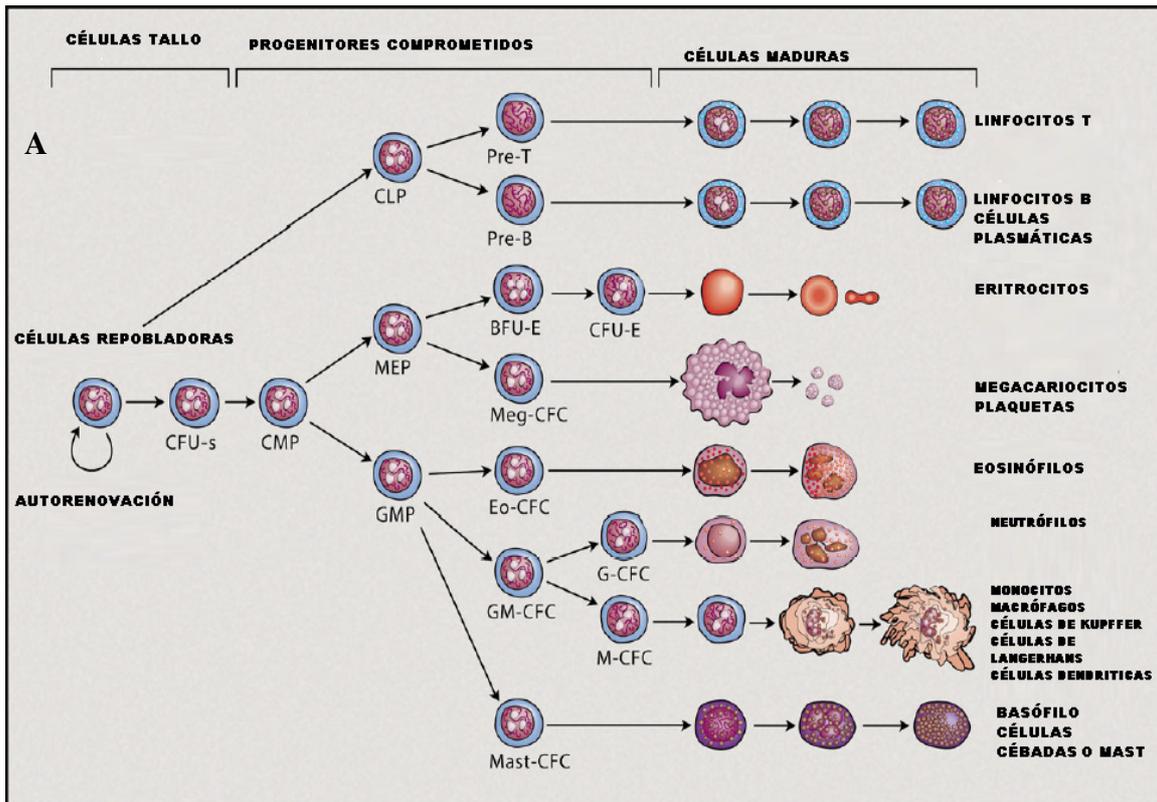


Figura 1. A. Desarrollo tradicional de la Hematopoyesis. Árbol que muestra como las células maduras hematopoyéticas de todos los linajes son originadas a partir de células tallo B. La hematopoyesis comienza en el saco vitelino con posteriores migraciones que siembran el hígado fetal. Esta población es transitoria y se reemplaza por la progenie de células hematopoyéticas generadas en la región-aorta-gónada mesonefros. Migraciones subsecuentes habitan la médula ósea en desarrollo y el bazo. (Tomado y modificado de Metcalf, 2007a).

---

---

Por otra parte, la supresión de la hematopoyesis está bajo el control de citocinas originalmente reconocidas como reguladoras de procesos inflamatorios o inmunes, entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). (Jacobsen et al, 1994; Hamblin 1993; Metcalf 1985).

---

---

## FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA

Existen dos citocinas que responden a este nombre, el factor de necrosis tumoral alfa o cachectina (TNF- $\alpha$ ) y factor de necrosis tumoral beta o linfotoxina (TNF- $\beta$ ). Ambas citocinas son codificadas por genes distintos e interaccionan con los mismos receptores de membrana, además de estar implicadas en la respuesta del organismo contra enfermedades (Tracey & Cerami 1994). El gen para el TNF- $\alpha$  codifica para una pro-hormona que atraviesa la membrana celular como un polipéptido de 26 kDa (Kriegler et al, 1988; Perez et al, 1990; Jue et al, 1990), una vez unida a membrana esta forma bioactiva está involucrada en las actividades parácrinas del TNF- $\alpha$  en diversos tejidos. Cuando es enfrentada a endotoxinas bacterianas, como por ejemplo lipopolisacárido (LPS) y otros estímulos, la forma precursora es cortada por enzimas proteolíticas creando así una forma madura de 17 kDa (Pennica et al, 1984; Davis et al, 1987). Tres de estos monómeros se asocian de forma no-covalente para formar un trímero, que construye finalmente la forma bioactiva del TNF- $\alpha$  predominante en suero y fluidos corporales (Smith & Baglioni 1987; Jones et al, 1989).

En un principio se pensaba que el TNF- $\alpha$  era exclusivamente producido por monocitos y macrófagos (Lange 1991; Lejeune et al, 1998), sin embargo se ha observado in vitro, que existen muchos tipos celulares capaces de sintetizar TNF- $\alpha$  (Sidhu & Bollon 1993), entre estos: las células de leucemia promielocítica aguda, timocitos, linfocitos T y B, células NK, fibroblastos (Bharat & Jordan 1992; Hamblin 1993) y más recientemente se ha demostrado que células CD34+ humanas expresan constitutivamente el gen de TNF- $\alpha$  entre otros (Janowska et al, 2001).

Diversos estudios han relacionado el tipo de receptor expresado con la supresión hematopoyética inducida por el TNF- $\alpha$ , de esta manera se sabe que los receptores p55 y p75 están involucrados en la supresión de la proliferación de las células CD34+ y células Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> respectivamente (Rusten *et al*, 1994; Fahlman et al,

---

---

1994). Asimismo se ha intentado correlacionar la ruta metabólica activada ya sea por apoptosis o arresto en el ciclo celular con el tipo de receptor, sin embargo el papel de los receptores en la inhibición de la hematopoyesis no es del todo claro y en su mayoría controversial, por ejemplo el efecto apoptótico del TNF- $\alpha$  está bien documentado y principalmente mediado a través del receptor p55 (Baker & Reddy 1996; Yuan 1997; Zheng *et al*, 1995), así en las células T humanas de individuos adultos la expresión de p55 pero no p75 incrementa la susceptibilidad a apoptosis inducida por el TNF- $\alpha$  (Aggarwal et al, 1999), sin embargo también se ha reportado que el receptor p55 esta involucrado en una ruta no apoptótica (Rath & Aggarwal 1999), mientras que el receptor p75 puede participar en la inducción de apoptosis (Baxter et al, 1999), o suprimir la proliferación sin muerte celular (Zheng et al, 1995).

---

---

## **EFFECTOS BIOLÓGICOS DEL TNF- $\alpha$ .**

El TNF- $\alpha$  muestra una amplia gama de efectos biológicos que en general, no son especie-específicos (Aiyer & Aggarwal 1988). En estudios in vitro se mostró que actúa selectivamente sobre líneas celulares transformadas, no teniendo efecto sobre células normales en cultivo salvo ciertas excepciones en las que, en determinadas condiciones inhibe la proliferación de fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y queratinocitos (Sugarman et al, 1985; Fransen et al, 1986).

El TNF- $\alpha$  puede inducir necrosis o muerte por apoptosis, dependiendo de la célula blanco y de la presencia de inhibidores metabólicos (Schmid et al, 1986; Grooten et al, 1993), de igual manera está involucrado en la inducción y expresión de genes, en procesos inflamatorios, reparación de tejidos, respuesta inmune y hematopoyesis, se le ha detectado como agente importante en cuadros de artritis e infecciones víricas y bacterianas.

El TNF- $\alpha$  es un importante inmunomodulador y agente antitumoral tanto in vitro como in vivo, es por ello que ha sido estudiado con el objetivo de establecer una alternativa terapéutica en tratamientos de cáncer. Así en estudios preclínicos se ha administrado en combinación con otras citocinas y agentes quimioterapéuticos (Beyert & Fiers 1998), sin embargo sólo en muy pocos casos se han logrado actividades sinérgicas favorables y remisiones parciales (Negrier et al, 1992).

El papel del TNF- $\alpha$  en hematopoyesis se ha estudiado ampliamente; anteriormente se le conocía como un factor citotóxico, sin embargo estudios posteriores demostraron que el TNF- $\alpha$  tenía propiedades estimuladoras del crecimiento en diversos tipos celulares (Vilcek et al, 1986; Digel et al, 1989). Además, se reportan efectos tanto estimuladores como inhibidores de células tallo y células progenitoras hematopoyéticas, dependiendo de los factores de crecimiento usados como suplementos. Así, el TNF- $\alpha$  estimula el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas humanas estimuladas con interleucina-3

---

---

(IL-3) y factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF) donde eleva el crecimiento de cultivos de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de ratón (Blackx et al, 1991; Caux et al, 1990); pero inhibe fuertemente a células incubadas con factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor de células tallo (SCF) (Murphy et al, 1988; Degliantoni et al, 1985; Caux et al, 1990). Otros trabajos, reportan que el TNF- $\alpha$  murino inhibe el crecimiento de células formadoras de colonias con alto potencial proliferativo (CFC-APP) a partir de células progenitoras hematopoyéticas primitivas LIn<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup> a pesar de la presencia de factores de crecimiento en estos experimentos (Zhang et al, 1995). Además el TNF- $\alpha$  aumenta la sobrevivencia de cultivos individuales de células Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> en cultivos tratados con IL-1 $\beta$ , producto de un incremento en el número de células viables y supresión de apoptosis. Este sinergismo entre TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , el responsable de la supresión de apoptosis en células progenitoras Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> in vitro, es relevante debido al papel radioprotector (Neta et al, 1988) que de manera sinérgica tienen ambas citocinas.

La inhibición hematopoyética debida al TNF- $\alpha$  es *variable* (Munker 1998), y el efecto puede ser *indirecto*, el cual depende de la fracción celular separada de la médula ósea y del tipo de medio condicionado empleado como fuente que libera factores de crecimiento hematopoyético. La acción indirecta del TNF- $\alpha$  es mediante la liberación de factores supresores por células accesorias (Beutler et al, 1989), que pueden actuar junto con el TNF- $\alpha$  para observar finalmente la inhibición de la hematopoyesis (Martínez-Jaramillo et al, 2001; Lu et al, 1999; Yamaguchi et al, 1999; Murphy et al, 1988; Broxmeyer et al, 1986; Pennica et al, 1984).

Existe además evidencia que relaciona la activación de uno u otro receptor de TNF, a saber el p55 o p75 que a pesar de ser similares en su secuencia extracelular, sus dominios intracelulares son diferentes, y por tanto desempeñan diferentes funciones. La estimulación de p55 puede mediar citotoxicidad, proliferación de fibroblastos, resistencia a la clamidia, síntesis de

---

---

prostaglandinas; mientras que p75 puede mediar la proliferación de timocitos de ratón y humano, fibroblastos humanos, célula mononucleares y células natural killer (NK). Se ha observado que estos receptores pueden regular el crecimiento de progenitores de médula ósea primitivos, sin embargo debido a sus efectos bidireccionales es difícil asentar sus efectos en la regulación de la hematopoyesis in vivo (Lu et al,1999). Sin embargo se piensa que p55 pueda estar involucrado en mediar la inhibición inducida por TNF, del crecimiento de células tallo primitivas y células más comprometidas (células tallo hematopoyéticas: Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup> y células progenitoras hematopoyéticas Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup>).

---

---

## MODELOS CELULARES.

Esta ampliamente reportado que se pueden utilizar líneas celulares para observar los efectos moduladores en la hematopoyesis, en este trabajo se emplea un modelo de hematopoyesis normal, la línea multipotencial progenitora mieloide 32D de ratón y un modelo de hematopoyesis alterada, la línea celular de leucemia mielomonocítica WEHI-3 de ratón.

### 32D.

La línea celular 32D es una línea dependiente de interleucina-3 (IL-3), originalmente establecida a partir de un cultivo de médula ósea a largo plazo de ratones C3/HeJ, inyectados con un virus de leucemia murina Friend. (Greenberger et al, 1983).

En un inicio se pensaba que solo IL-3 podía favorecer la supervivencia y formación de colonias de 32D (Metcalf 1985), sin embargo, estudios posteriores revelaron que algunas de estas células podían mantener cierta sobrevivencia y clonogenicidad, aún en ausencia de IL-3, siempre y cuando el medio estuviera suplementado con G-CSF (Valtieri et al, 1987), GM-CSF y eritropoyetina (Migliaccio et al, 1989). Así, además de proliferar en respuesta a diferentes factores de crecimiento, estas células conservan su capacidad de diferenciación hacia distintos tipos celulares tales como basófilos y células cebadas (Migliaccio et al, 1989), granulocito-neutrófilos (Valtieri et al, 1987; Bigas 1998) y monocito-macrófagos (Kreider et al, 1990).

### WEHI-3.

Esta línea celular mantenida en cultivo desde 1974, establecida a partir de sangre periférica de ratón, es una línea celular de leucemia mielomonocítica. Dentro de sus características está el hecho de que secreta al medio CSA (colony-stimulating activity: actividad estimuladora de colonias), lisozima e Interleucina-3.

---

---

Se sabe que se inhibe su crecimiento en presencia de 4 ng/mL de lipopolisacárido, ó 30-40 g/ mL de sulfato dextrán. Estas células tienen la jerarquía hematopoyética de ser células inmaduras o progenitoras mielomonocíticas, y es ampliamente empleada para estudios sobre el control de la proliferación y diferenciación de células leucémicas (Metcalf, 1980).

---

---

### **Objetivo General**

Determinar si las caseínas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -) son responsables de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares 32D y WEHI-3 a través de la producción de TNF- $\alpha$ .

### **Objetivos Específicos**

Determinar el efecto de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína en la proliferación, viabilidad y diferenciación de la línea celular 32D y WEHI-3.

Determinar la presencia de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante del cultivo de células 32D y WEHI-3 tratadas con caseínas.

Determinar en células productoras de TNF- $\alpha$ , la participación de esta citocina en la inhibición de la proliferación de células tratadas con caseínas.

---

---

### **Hipótesis**

La  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseínas son responsables de la inhibición en la proliferación de las líneas celulares 32D y WEHI-3 a través de la producción de citocinas inhibidoras como el TNF- $\alpha$ .

Nombre de archivo: A6  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: II  
Asunto:  
Autor: Jouis  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:33 A.M.  
Cambio número: 3  
Guardado el: 14/11/07 02:47 A.M.  
Guardado por: Jouis  
Tiempo de edición: 3 minutos  
Impreso el: 02/01/01 04:31 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 16  
Número de palabras: 3,241 (aprox.)  
Número de caracteres: 18,479 (aprox.)

---

---

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Hemos mostrado que el CasNa inhibe la proliferación de la línea celular 32D vía producción de TNF- $\alpha$ . Sabemos que el CasNa esta integrado por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína, con la finalidad de analizar si una de tales subunidades es la responsable de mediar la actividad biológica inducida por el CasNa, hemos mostrado que todas las subunidades de caseína inhiben la proliferación de las células 32D y WEHI-3, pero no se conoce si también lo hacen vía producción de TNF- $\alpha$ .

Nombre de archivo: A5  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: III  
Asunto:  
Autor: Jouis  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:31 A.M.  
Cambio número: 2  
Guardado el: 14/11/07 02:47 A.M.  
Guardado por: Jouis  
Tiempo de edición: 1 minuto  
Impreso el: 02/01/01 04:31 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 1  
Número de palabras: 73 (aprox.)  
Número de caracteres: 418 (aprox.)

---

---

## **JUSTIFICACIÓN.**

El esclarecimiento del mecanismo de acción por el que las caseínas inducen sus efectos resulta interesante, ya que permitirá ampliar el conocimiento de los mecanismos básicos del control de la hematopoyesis tanto en células normales como transformadas por efecto de las caseínas. La información derivada en este estudio puede ser de utilidad para modular y corregir los problemas clínicos hemato-oncológicos.

Nombre de archivo: A7  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: JUSTIFICACIÓN  
Asunto:  
Autor: Jouis  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:35 A.M.  
Cambio número: 2  
Guardado el: 14/11/07 02:46 A.M.  
Guardado por: Jouis  
Tiempo de edición: 1 minuto  
Impreso el: 02/01/01 04:32 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 1  
Número de palabras: 61 (aprox.)  
Número de caracteres: 352 (aprox.)

---

**V. Hipótesis**

La  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseínas son responsables de la inhibición en la proliferación de las líneas celulares 32D y WEHI-3 a través de la producción de citocinas inhibitoras como el TNF- $\alpha$ .

---

---

## **VI. Objetivo General**

Determinar si las caseínas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -) son responsables de la inhibición de la proliferación de las líneas celulares 32D y WEHI-3 a través de la producción de TNF- $\alpha$ .

### ***Objetivos Específicos***

Determinar el efecto de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína en la proliferación, viabilidad y diferenciación de la línea celular 32D y WEHI-3.

Determinar la presencia de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante del cultivo de células 32D y WEHI-3 tratadas con caseínas.

Determinar en células productoras de TNF- $\alpha$ , la participación de esta citocina en la inhibición de la proliferación de células tratadas con caseínas.

---

---

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### **Líneas celulares.**

Para este trabajo se emplea la línea celular hematopoyética multipotencial 32D cl3 dependiente de interleucina-3 (IL-3) y la línea de leucemia mielomonocítica WEHI-3, ambas de ratón, fueron cultivadas en medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, USA). La línea 32D fue mantenida en cultivo a una densidad inicial de  $1 \times 10^5$  células/mL mas 0.5 ng/mL de interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3) y resembrada cada 48 horas en cajas Petri (Fisher Brand, Denmark), la línea WEHI-3 fue mantenida en cultivo a una densidad inicial de  $3 \times 10^4$  células/mL y resembrada cada 48 horas adicionando  $\beta$ -mercaptoetanol (0.05mM) manteniendo ambas líneas a una temperatura de 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Citocinas recombinantes y anticuerpos.**

Para este trabajo se utilizó interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3), factor de necrosis tumoral alfa recombinante de ratón (rmTNF- $\alpha$ ), anticuerpo monoclonal anti-factor de necrosis tumoral alfa de ratón (anti-TNF- $\alpha$ ) (R&D System, USA).

### **Evaluación de la proliferación.**

Las tres caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  (Sigma) se solubilizaron en agua desionizada y esterilizaron por autoclave. La proliferación de las células 32D con y sin tratamiento de caseínas se determinó mediante la técnica de incorporación del nucleótido timidina marcado con tritio [ $\beta$ -<sup>3</sup>H]dTTP al DNA en síntesis en las células en cultivo (Karp, 1996). Brevemente las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning NY, USA) a una densidad inicial de  $2 \times 10^4$  células/mL en las condiciones antes señaladas; adicionándose al inicio del cultivo las caseínas desde 0 a 4 mg/mL, CasNa como control positivo 2 mg/mL y agua desionizada como control del vehículo manteniéndose en condiciones de cultivo por 56 horas, momento en que se adiciona 1 $\mu$ Ci de [ $\beta$ -<sup>3</sup>H]dTTP/mL timidina.

---

---

Terminado el tiempo de cultivo (72 horas) se colocó la placa a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente se descongeló y congeló una vez más, repitiéndose el proceso dos veces con el fin de liberar los núcleos y despegar la población adherente. Finalmente se cosechó, lavó y colocó las células en viales con 2 mL de líquido de centelleo (Beckman, USA), por último se cuantificó la emisión de luz como cuentas por minuto (cpm) en un contador de emisión beta (Beckman Ls6500). Las lecturas en cpm se convirtieron a porcentaje de proliferación donde los cultivos sin tratamiento representan el 100%.

### **Evaluación de viabilidad.**

La viabilidad fue evaluada determinando la actividad metabólica mediante la reducción de MTT. Brevemente, las células tratadas con el CasNa, o las caseínas fueron incubadas en la misma placa de cultivo con 20  $\mu\text{l}$  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).

### **Evaluación de la diferenciación.**

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.

Los anticuerpos usados para citometría fueron: -Anti-Fms (CSF-1) extracelular 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<sub>2b,κ</sub> como control de isotipo.

### **Producción de TNF- $\alpha$**

La inducción a la producción a nivel de proteína de la citocina se determinó mediante el ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays). A continuación se explica brevemente el ensayo:

ELISA para TNF- $\alpha$ . Se empleó el KIT KMC3012 (Biosource). Brevemente a una placa de 96 pozos previamente tratada con anticuerpo de captura anti-TNF- $\alpha$  se adicionaron 100  $\mu$ l/pozo de buffer estándar, 100  $\mu$ l/pozo de citocina recombinante en curva dosis respuesta comenzando en 1.2 ng/ml de rmTNF- $\alpha$  y 50  $\mu$ l/pozo de buffer estándar mas 50  $\mu$ l de sobrenadante a probar, agitando gentilmente la placa para homogenizar. Posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ l/pozo de anticuerpo biotin-conjugado, agitando nuevamente e incubando 90 minutos a temperatura ambiente.

Concluido el tiempo de incubación se descartó el medio y lavó cuatro veces con 400  $\mu$ l de solución de lavado 30 segundos/lavado y hacia el último lavado se golpeó gentilmente la placa para retirar la humedad, adicionando 100  $\mu$ l/pozo de estreptavidina-HRP, cubriendo e incubando por 30 minutos.

Transcurrido el tiempo de incubación se descartó el medio y lavó cuatro veces, adicionando 100  $\mu$ l/pozo de cromógeno tetrametilbencidina (TMB) incubando 25 minutos en oscuridad. Finalmente se detuvo la reacción con 100  $\mu$ l/pozo de solución de paro y leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Tecan).

---

---

## **Evaluación de la participación del TNF- $\alpha$ .**

Se realizaron ensayos donde se identificó la participación del TNF- $\alpha$  en aquellos casos en que este es secretado al medio condicionado, por estímulo de alguna caseína. Para ello se efectuaron ensayos de bloqueo con anticuerpo neutralizante en cultivos de células 32D estimuladas con la caseína que participa en la producción de TNF- $\alpha$ . Brevemente, se cultivaron células 32D a una densidad inicial de  $1 \times 10^4$  cel/mL en placas de 96 pozos. Se consideraron controles positivos de citocina recombinante y 16  $\mu$ g/mL de anticuerpo mas citocina (dosis necesaria para bloquear la actividad del recombinante) incubados por una hora a 37° C de manera previa a la adición al cultivo.

Pasadas 56 horas de cultivo, se adicionó 1 $\mu$ Ci de [ $\beta$ - $^3$ H]dTTP/mL timidina. Concluidas las 72 horas de cultivo se colocó la placa a -70°C por 24 horas. Posteriormente se descongeló y congeló una vez mas, repitiéndose el proceso dos veces con el fin de liberar los núcleos y despegar la población adherente. Finalmente se cosechó, lavó y colocó las células en viales con 2 mL de líquido de centelleo (Beckman, USA), por último se cuantificó la emisión de luz como cuentas por minuto (cpm) en un contador de emisión beta (Beckman Ls6500). Las lecturas en cpm se convirtieron a porcentaje de proliferación donde los cultivos sin tratamiento representan el 100%.

### **Manejo de datos.**

Los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente. Los ensayos de incorporación de 3H-timidina fueron realizados por cuadruplicado y se presentan como porcentaje de emisión de cuentas por minuto respecto a un control absoluto; los ensayos de viabilidad fueron realizados por triplicado; las tinciones citoquímicas por duplicado. Para el ensayo de ELISA, se probó el medio de al menos tres ensayos independientes con dos repeticiones por ensayo. A los datos de proliferación y viabilidad se les realizó una prueba t de Student ( $P < 0.05$  y  $0.01$ , respecto al cultivo con solo vehículo) a menos que se indique otra

---

---

cosa, realizándose previamente una prueba de Levene para determinar si las varianzas son iguales o diferentes, se expresa la media y su desviación estándar

---

---

## RESULTADOS.

### OBJETIVO 1.

Determinar el efecto de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína en la proliferación, viabilidad y diferenciación de la línea celular 32D y WEHI-3 de ratón.

*La  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína suprimen la proliferación de 32D y WEHI, e inducen diferenciación sólo de las células 32D sin afectar la viabilidad celular.*

### PROLIFERACIÓN.

Con la finalidad de corroborar que las caseínas inhiben la proliferación de las células 32D a pesar de la presencia de 0.5 ng/mL de rmIL-3 y de las células WEHI-3 de ratón, fueron cultivadas con o sin alfa-, beta- o kappa-caseína ( $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\kappa$ -caseína respectivamente) por separado, y utilizando a CasNa como positivo de inhibición de la proliferación de 32D. Se realizaron ensayos dosis-respuesta desde 0 a 4 mg/mL de caseína los cuales fueron evaluados a las 72 horas de cultivo, por medio de la incorporación de 3H-timidina. Los resultados confirman que las caseínas bloquean significativamente la proliferación celular en ambas líneas celulares de manera dosis-dependiente de manera análoga al CasNa, nuestro control positivo de inhibición de la proliferación. Así se observó en 32D que desde 0.5 mg/mL de  $\alpha$  y  $\kappa$  caseínas, y 0.1 mg/mL de  $\beta$ -caseína, la proliferación es del 80% respecto al control, bloqueo que se acentúa de manera dosis dependiente hasta 4 mg/mL donde la proliferación es aproximadamente del 20% ( $\alpha$  ó  $\beta$ -caseína) o incluso nula para el caso de  $\kappa$ -caseína (Ver Figura 2). Es interesante señalar que el bloqueo de la proliferación con la dosis de 1 mg/mL es incluso significativo con una  $p < 0.01$ , para las tres clases de caseína.

En el caso de la línea celular leucémica mielomonocítica WEHI-3, se muestra un comportamiento diferente a la línea 32D, ya que únicamente a partir de 1 mg/mL  $\alpha$ - y  $\beta$ -caseínas, al igual que CasNa, bloquean ligeramente la proliferación; a diferencia de  $\kappa$ -caseína que a una dosis de tan sólo 0.5 mg/mL resultó con un mayor efecto negativo sobre la proliferación, incluso que el CasNa, es importante

---

---

señalar que la proliferación se redujo a un 5% en la dosis de 2 mg/mL y casi a su totalidad a la dosis más alta de 4 mg/mL. (Ver Figura 4).

### **VIABILIDAD.**

Para poder descartar la posibilidad de que la disminución en la proliferación observada por los compuestos empleados sea consecuencia de citotoxicidad, se evaluó la viabilidad de las células con tratamiento de caseínas por la técnica de MTT. Los resultados indican, que la viabilidad celular de las células 32D no se vio afectada por efecto de la adición de las caseínas al cultivo, ya que aun en las dosis con mayor inhibición de proliferación (1 y 2 mg/mL), la viabilidad se mantuvo superior al 95%, y sólo en la dosis de 4 mg/mL de beta caseína la viabilidad disminuye al 72%. Estos resultados confirman que la reducción en la proliferación por efecto de las caseínas no se debe a citotoxicidad (Ver Figura 3).

Por otro lado, y a diferencia de 32D, en las células WEHI-3 la viabilidad se redujo significativamente con 2 mg/mL de CasNa y con las caseínas a partir de 1 mg/mL, sin embargo la viabilidad también fue cercana al 90%, a excepción de la dosis superior (4 mg/mL) donde  $\beta$ - y  $\kappa$ - caseínas redujeron la viabilidad hasta llegar a casi un 32 y 15% respectivamente (Ver Figura 5).

Así, los resultados indican que ambas líneas celulares mantienen la viabilidad cerca del 90%, y sólo las dosis más altas tanto el control (CasNa), como de las caseínas impactan negativamente la viabilidad; esto se traduce en que el abatimiento en la proliferación celular de 32D y WEHI en las concentraciones inferiores no es ocasionado por citotoxicidad de las caseínas.

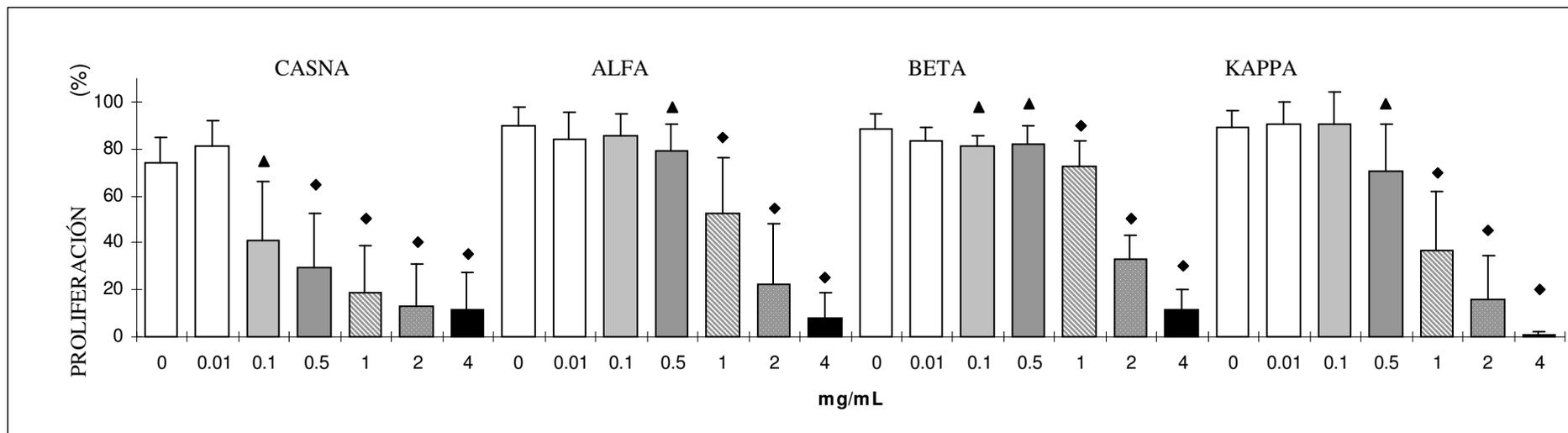


Figura 2. Porcentaje de proliferación de células 32D en presencia de caseínas. Células 32D cultivadas por 72 horas en diferentes concentraciones de caseínas (Adicionalmente, se muestra CasNa como un control positivo de inhibición de proliferación). La proliferación se expresa como el porcentaje de incorporación de <sup>3</sup>H timidina respecto al vehículo. La diferencia significativa (▲P<0.05 y ◆P<0.01) con respecto a 0 mg/mL.

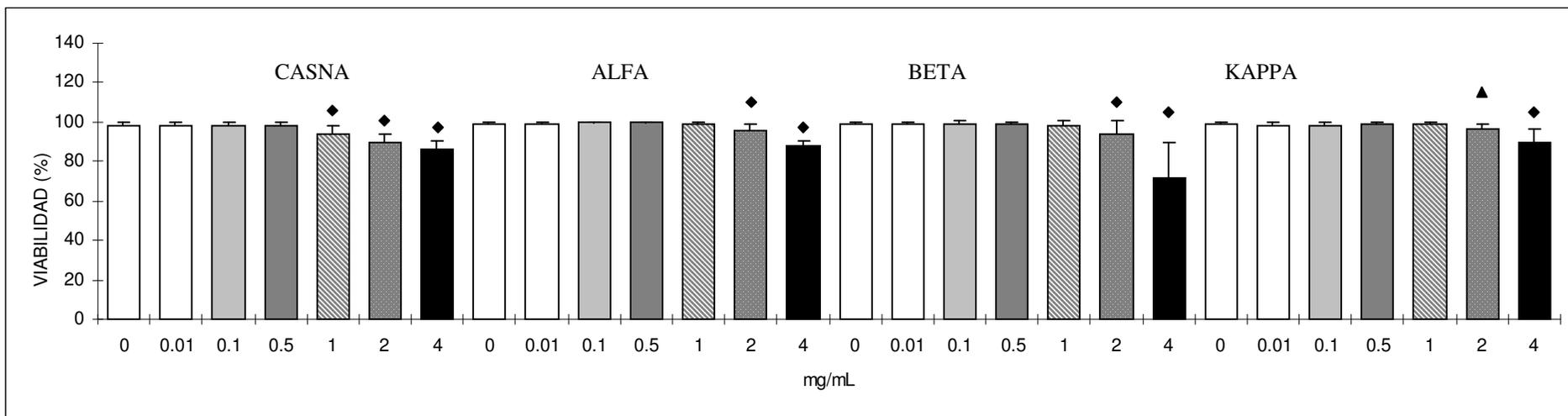


Figura 3. Porcentaje de Viabilidad de células 32D en presencia de caseínas. La línea celular 32D fue cultivada durante 72 horas a diferentes concentraciones de caseínas, la viabilidad celular se valoró por reducción de MTT. Se muestra CasNa como un control positivo de inhibición de proliferación. La diferencia significativa (▲P< 0.05 y ◆P<0.01) con respecto a 0 mg/mL.

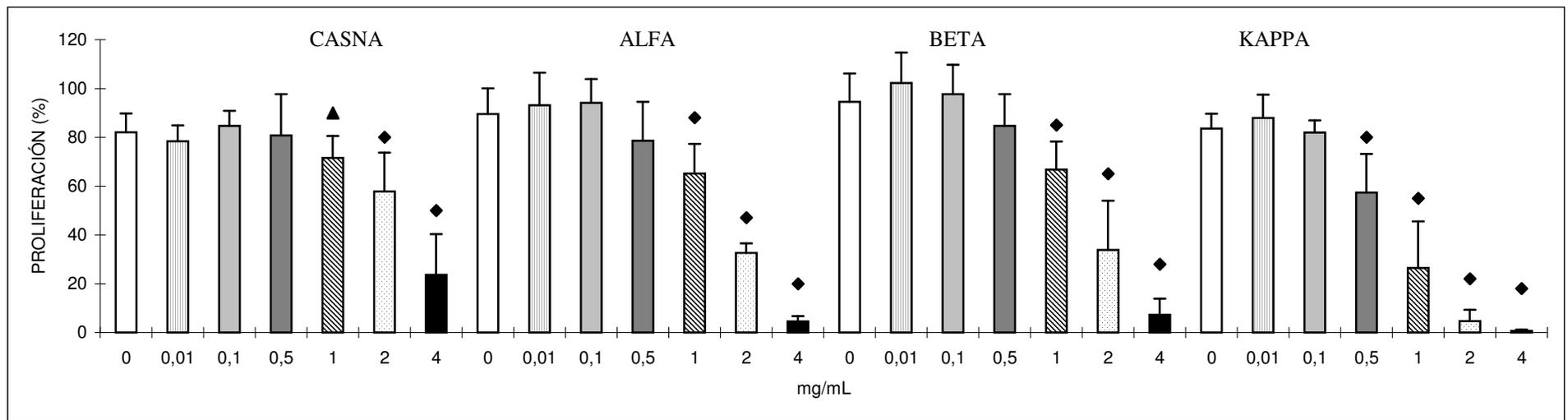


Figura 4. Porcentaje de proliferación de células WEHI-3 en presencia de caseínas. Células WEHI-3 cultivadas por 72 horas en diferentes concentraciones de caseínas (Adicionalmente, se muestra CasNa como un control positivo de inhibición de proliferación). La proliferación se expresa como el porcentaje de incorporación de  $^3\text{H}$  timidina respecto al vehículo. La diferencia significativa ( $\blacktriangle P < 0.05$  y  $\blacklozenge P < 0.01$ ) con respecto a 0 mg/mL.

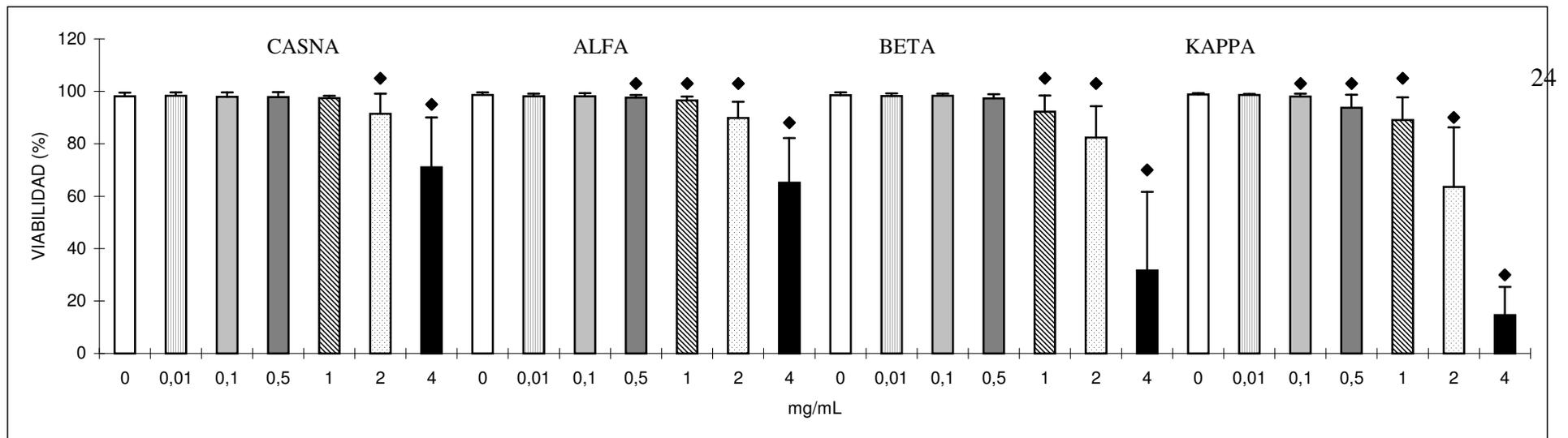


Figura 5. Porcentaje de Viabilidad de células WEHI-3 en presencia de caseínas. La línea celular WEHI-3 fue cultivada durante 72 horas a diferentes concentraciones de caseínas, la viabilidad celular se valoró por reducción de MTT. Se muestra CasNa como un control positivo de inhibición de proliferación. La diferencia significativa ( $\blacktriangle P < 0.05$  y  $\blacklozenge P < 0.01$ ) con respecto a 0 mg/mL.

---

---

## DIFERENCIACIÓN CELULAR.

Para hacer un análisis comparativo de la posible inducción de diferenciación por tratamiento de las tres clases de caseína, elegimos la dosis que reducía significativamente la proliferación sin afectar la viabilidad, así usamos 1 mg/mL para el análisis de diferenciación con tinciones citoquímicas específicas para los linajes granulocito neutrófilo (cloro acetato esterasa) y monocito macrófago ( $\alpha$ -naftil acetato esterasa) y los resultados de la tinción muestran que en células 32D condiciones basales el cultivo control tiene un 51% de células tipo granulocito, y un 4% de células monocíticas; estos niveles fueron modificados por la adición de las caseínas donde  $\alpha$ -caseína fue la que indujo un mayor aumento de células de linaje monocítico de 4% hasta un 26%, en menor porcentaje  $\beta$ -caseína de un 4 a 24%, y la de menor aumento de células monocíticas fue  $\kappa$ -caseína con un aumento de 4 a 13%. Cabe mencionar que el incremento en células 32D con características de tipo macrofágico fue significativo en los tres casos con respecto al vehículo (Ver Tabla 1).

Para el caso de la línea celular WEHI-3, los niveles de células monocíticas se mantuvo siempre cerca del 5%, aún en las células con tratamiento de CasNa o caseínas, mientras que los granulocitos se mantuvieron entre el 65 y 75%, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas en cuanto a tratamientos respecto al control. Así, los resultados obtenidos con esta técnica confirman que las caseínas inducen la diferenciación hacia el linaje macrofágico, mostrando a la  $\alpha$ -caseína con un comportamiento similar a nuestro control positivo CasNa; en contraste, en el caso de WEHI-3, se observa que la adición de caseínas aun cuando reducen significativamente la proliferación no existe desplazamiento en cuanto a los porcentajes de diferenciación (Ver Tabla 1).

Por otro lado, se evaluó la expresión de antígenos de superficie asociados a los linajes hematopoyéticos antes mencionados, así analizamos la expresión del receptor del M-CSF (M-CSFR) y la proteína de superficie Ly-6G (Gr-1). Para

---

---

ello, se emplearon líneas celulares positivas para cada linaje para probar la especificidad para el linaje de los anticuerpos, P-388 como positivo para la expresión de M-CSFR (linaje monocítico), y células en banda de médula ósea de ratones CD-1 separadas por Ficol para la expresión de Gr-1 (linaje granulocítico). Además se usaron como controles un isotipo, controles negativos de células en banda para la expresión de M-CSFR y la línea fibroblástica L-929 para la expresión de Gr-1 (Datos no mostrados).

Una vez establecidos los controles, se evaluó la fluorescencia emitida por células sin anticuerpo, con isotipo y con cada anticuerpo específico. Se obtuvo un índice de fluorescencia (IF) al dividir la intensidad de fluorescencia de las células con anticuerpos específicos, entre la fluorescencia de las células con su isotipo, de tal manera que el  $IF=1$  indica que la fluorescencia de las células con el anticuerpo es el doble de las células con solo isotipo. Los niveles basales de ambos antígenos evaluados en las células 32D y WEHI-3 son menores en 32D respecto a WEHI-3, datos que coinciden con los reportes para estas líneas celulares (Ver Tabla 1).

Los resultados corroboran los estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Ramos, 2004), ya que confirman a la  $\alpha$ -caseína como la molécula con un mayor poder inductor de células de tipo monocítico (índice de fluorescencia de 1 a 2.12). En el caso de la línea celular WEHI-3 no se observan cambios significativos en la diferenciación incluso en presencia de CasNa o caseínas (Ver Tabla 1).

32D	Citoquímica (%)		FACS	
	Granulocitos	Monocitos	(Gr-1)	(anti-Fms)
Vehículo	51±10.5	4±1.9	1	1
CasNa (+)	26± 11.4	26±4.1*	1.34	2.63
a-cas	34±12.4	26±11.7*	1.61	2.12
b-cas	40±11.2	23±8.7*	1.85	2.09
k-cas	42±9.8	13±3.6*	1.5	1.31
WEHI-3	Citoquímica (%)		FACS	
	Granulocitos	Monocitos	(Gr-1)	(anti-Fms)
Vehículo	75±7.3	2.5±1.7	1	1
CasNa (+)	70±9	3±1.0	1.2	1.21
a-cas	65±5	3±1.3	1.34	1.47
b-cas	71±10.5	4±1.0	1.21	1.48
k-cas	72±8.0	3±3.0	1.23	1.45

Tabla 1. Porcentaje de Granulocitos y monocitos en células 32D y WEHI-3 estimuladas con o sin caseínas (1 mg/mL) durante 72 horas. Evaluación por tinción citoquímica, los datos (expresados como porcentaje) presentan el promedio y desviación estándar; diferencia significativa con respecto al vehículo: ( \* ) CasNa se usó como control positivo de diferenciación. La expresión de marcadores de superficie de membrana observada por FACS (Citometría de flujo), Gr1 para granulocitos, anti-Fms para macrófagos: los resultados se expresan como el índice de fluorescencia (fluorescencia del tratamiento/fluorescencia control). Kapa-caseína: k-cas, Beta-caseína: b-cas, Alfa-caseína: a-cas.

Condición	32D TNF- $\alpha$ ng/mL	WEHI-3 TNF- $\alpha$ ng/mL
Blanco	0	pdr
PBS	0	pdr
CasNa (+)	2.19 ±0.297*	pdr
k-cas	0	pdr
b-cas	0	pdr
a-cas	0.405±0.064*	pdr

Tabla 2. Expresión de TNF- $\alpha$ . Se muestran los resultados de los ensayos ELISA evaluado a partir de los sobrenadantes de cultivos a 72 horas de células 32D en presencia de caseínas. Se considera a las células 32D tratadas con CasNa como control positivo de inducción. Se muestran las desviaciones estándar para cada caso. diferencia significativa con respecto al blanco (0 ng/ml) ( \* ) con una p<0.05. Kapa-caseína: k-cas, Beta-caseína: b-cas, Alfa-caseína: a-cas; pdr: por debajo del rango.

---

---

## **OBJETIVO 2.**

Determinar la presencia de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante del cultivo de 32D y WEHI-3 tratadas con caseínas.

### *Alfa caseína induce la producción de TNF- $\alpha$ , sólo en las células 32D.*

Estudios previos de nuestro equipo de trabajo demostraron que el CasNa induce la secreción de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de células 32D, donde es la principal citocina responsable del abatimiento de la proliferación en cultivos con CasNa. Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína, las principales moléculas componentes del caseinato de sodio, en su capacidad para inducir la secreción de TNF- $\alpha$  al sobrenadante de cultivos de células 32D. Se observó que las dosis que inhiben la proliferación celular de 32D y WEHI-3 es entre 0.5 y 2 mg/mL, se estimularon a las células con la dosis mayor para obtener la mayor cantidad de citocina en los sobrenadantes de ambas líneas sin afectar su viabilidad. Por lo tanto se cultivaron células 32D con 2 mg/mL de cada caseína por separado, de los cuales se obtuvieron los medios condicionados en los que se evaluó la presencia de citocina TNF- $\alpha$  por ensayo de ELISA. Se utilizó además un control con 0 mg/mL de caseína, vehiculo, y como control positivo CasNa.

Los resultados muestran que en la línea celular 32D, de las tres caseínas, sólo  $\alpha$ -caseína (2 mg/mL), induce la expresión de TNF- $\alpha$  a 0.405 ng/mL, sin embargo, los niveles producidos no son el total que se observa con nuestro positivo CasNa 2.19 ng/mL (Ver Tabla 2). En contraste, en la línea celular WEHI-3 no se detectó la presencia de TNF- $\alpha$  en ninguna de las condiciones, lo cual indica que la inhibición de la proliferación de esta línea no es debida al TNF- $\alpha$ .

---

---

### **OBJETIVO 3.**

Determinar en células productoras de TNF- $\alpha$ , la participación de esta citocina en la inhibición de la proliferación de células tratadas con caseína.

*TNF- $\alpha$  es el responsable de la inhibición a la proliferación en células 32D tratadas con alfa-caseína.*

Debido a que no se encontraron niveles perceptibles de la citocina TNF- $\alpha$  en el caso de la línea celular WEHI-3, y una vez demostrado que  $\alpha$ -caseína es la única caseína donde se detectó inducción de la expresión de proteína de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de las células 32D, se buscó determinar si este TNF- $\alpha$  es el responsable de la inhibición a la proliferación.

Así para determinar el papel del TNF- $\alpha$  en la inhibición de la proliferación de células tratadas con  $\alpha$ -caseína, se estimularon células 32D por 72 horas con  $\alpha$ -caseína más anticuerpo neutralizante dirigido contra TNF- $\alpha$  de ratón en dosis suficiente para bloquear la actividad 10 ng/mL de citocina recombinante. Debido a que en cada una de las caseínas, la proliferación de la línea celular 32D fue inhibida significativamente en su proliferación con la dosis de 1mg/mL, (Ver Figura 2) sin afectar su viabilidad (Ver Figura 3), se eligió a esta como la dosis para este ensayo.

De manera similar a lo observado con anterioridad con CasNa, los resultados muestran que el TNF- $\alpha$  secretado por estímulo de  $\alpha$ -caseína inhibe la proliferación en las células 32D, sin embargo, a diferencia de CasNa, la adición de anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  neutralizó todo el efecto antiproliferativo provocado por  $\alpha$ -caseína de esta manera es el TNF- $\alpha$  en cultivos con  $\alpha$ -caseína el responsable del bloqueo de la proliferación (Ver Figura 5).

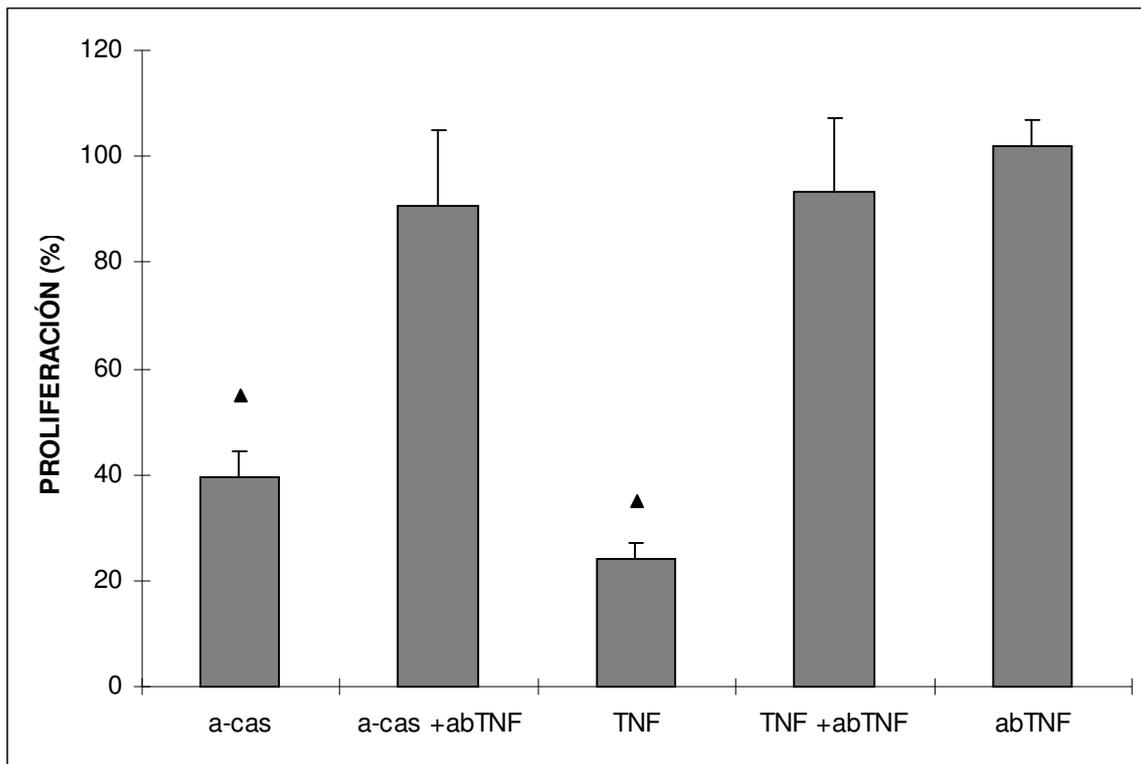


Figura 5. Proliferación de células 32D después de 72 horas de cultivo sin y con 1 mg/mL  $\alpha$ -caseína, mas 16  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti TNF- $\alpha$  (abTNF) sin y con 10 ng/mL de rmTNF- $\alpha$  usado como testigo positivo (TNF). Porcentaje de incorporación de [3H] timidina al DNA con respecto al negativo (100%). Los datos presentan el promedio y desviación estándar, la diferencia fue significativa ( $\blacktriangle$ ) respecto al negativo con una  $p < 0.05$ , a-cas: alfa caseína.

---

---

## DISCUSIÓN.

De las proteínas de la leche la caseína constituye más del 80 % de total. La caseína está integrada por la subunidad alfa, beta y kappa-caseína. Además del papel nutricional, las caseínas y algunos péptidos derivados regulan la respuesta inmune (Wong et al, 1996). Así regulan la actividad funcional de linfocitos, neutrófilos y macrófagos (Pessi et al, 2001, Wong et al, 1996), sin embargo el estudio de los efectos en el proceso hematopoyético ha sido poco estudiado.

Algunos trabajos indican que la  $\alpha$ -caseína estimula la proliferación de linfocitos T (Pessi et al, 2001) y la  $\beta$ -caseína lo hace en linfocitos estimulados con Concanavalina A (Wong et al, 1996). Nuestro grupo de trabajo ha mostrado que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de caseína, tiene la capacidad de inhibir la proliferación de las células 32D, a la vez que induce su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago (Ledesma, 2006). Este grupo de datos claramente muestran que la sal de la caseína puede modular la mielopoyesis, pero no se conoce si alguna de las subunidades integrantes; alfa, beta y kappa-caseína, es la responsable de la actividad inhibidora de la proliferación mediada por el CasNa.

En este trabajo se muestra todas las subunidades de caseínas, componentes del caseinato de sodio, tienen la capacidad para inhibir la proliferación de 32D y WEHI-3. Esto muestra un efecto diferencial en ambas líneas celulares ya que en las células 32D, el CasNa y las caseínas desde dosis bajas ya reducen su proliferación mientras que para la línea celular WEHI-3 se necesitan dosis más elevadas, excepto para la  $\kappa$ -caseína quien muestra un mayor efecto inhibitorio de la proliferación. Por otro lado, la disminución de la proliferación de 32D es a costa de un mayor comprometimiento en la diferenciación de las células hacia el linaje monocito-macrófago, en contraste con WEHI-3 donde las células no son inducidas a la diferenciación, lo cual sugiere tanto las caseínas como el CasNa actúan como agentes citostáticos en las células WEHI-3. Así de estos datos se deduce que las caseínas tienen un efecto diferencial sobre las células dependiendo de su naturaleza, funcionando como moléculas inhibitoras de la

---

---

proliferación de células tanto normales como leucémicas, pero induciendo la diferenciación sólo de aquellas consideradas como normales.

La ausencia de diferenciación en WEHI-3 no sorprende ya que al tratar células WEHI-3 con G-CSF, no se induce diferenciación granulocítica; así como al adicionar GM-CSF, tampoco se induce diferenciación monocítica, a menos que se induzca de manera externa a expresar el receptor para uno u otro factor (Li et al, 1993). Hemos mostrado que las células WEHI-3 tratadas con CasNa y las diferentes subunidades de caseínas inducen la expresión del receptor para el GM-CSF, y a pesar que expresan en forma constitutiva al GM-CSF (Melo B, 2004), en el presente trabajo no detectamos diferenciación de las células WEHI-3. Este conjunto de datos indica que las células WEHI-3 pueden necesitar más de este factor de crecimiento hematopoyético para poder diferenciarse.

Si bien, un descenso en la proliferación puede deberse a un aumento de la diferenciación, también existe la posibilidad de que la causa sea un efecto citotóxico de la molécula estudiada (Freshney, 1994), los resultados aquí obtenidos muestran que la viabilidad de 32D se mantiene por arriba del 95% y por arriba del 85% en WEHI-3 por lo tanto no son tóxicos para las células (Figura 3). Estos datos son similares a los obtenidos en linfocitos expuestos a 1 mg/mL de  $\alpha$ -caseína (Pessi et al, 2001), ó 0.4 mg/mL (Wong et al, 1996) donde la viabilidad no es afectada.

Por otro lado, existen amplios estudios sobre la regulación de la hematopoyesis en los que se ha encontrado que en células CD34+ humanas extraídas de médula ósea existen transcritos para una gran cantidad de quimiocinas, factores de crecimiento, y citocinas, dentro de las que se encuentra el TNF- $\alpha$ , capaces de regular la hematopoyesis mediante ciclos autócrinos/parácrinos en estas células hematopoyéticas primitivas (Majka et al, 2001). Estudios análogos, han encontrado RNAm para citocinas capaces de regular negativamente el proceso hematopoyético como MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  (Cluitmans et al, 1995). Estos antecedentes dieron pauta a plantear la posibilidad de que otras células primitivas

---

---

hematopoyéticas de ratón como las 32D, al ser tratadas con caseínas y sus análogos (CasNa, caseína), fueran inducidas a expresar y liberar citocinas que regularan su proliferación. Estos reportes concuerdan con recientes resultados de nuestro grupo de investigación que muestran una inducción de la expresión de RNAm para TNF- $\alpha$  en células progenitoras mieloides 32D, datos que se correlacionan con la expresión de proteína observada por ensayos ELISA (Ledesma, 2006). De manera análoga, esta tesis muestra que sólo las células 32D tratadas con  $\alpha$ -caseína producen concentraciones por encima del rango de detección de TNF- $\alpha$ , sin alcanzar los niveles inducidos por el CasNa (Ver Tabla 3). A pesar que la  $\alpha$ -caseína induce la producción de bajos niveles de TNF- $\alpha$ , la adición de anticuerpo dirigido contra el TNF- $\alpha$ , anula el efecto negativo sobre la proliferación de 32D, lo cual sugiere que la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -caseína se debe a la inducción de TNF- $\alpha$  (Ver Figura 5).

En este sentido existen reportes que muestran que las células CD34+ de médula ósea normal poseen una expresión constitutiva de RNAm para TNF- $\alpha$  y sus receptores p55 y p75 (Janowska et al, 2001), sin embargo, estudios similares no han reportado la presencia de la proteína TNF- $\alpha$  en estas células (Majka et al, 2001), hasta que nuestro grupo de trabajo demostró la expresión de proteína de TNF- $\alpha$  en células progenitoras de ratón, misma que es estimulada por efecto de la adición de IL-1 $\beta$  (Ledesma et al, 2004). Estos datos aunados a los del grupo de Majka, sostienen que células progenitoras pueden expresar proteínas para citocinas inhibitorias de la proliferación, que actúan dentro del microambiente de la médula ósea.

Otros estudios han demostrado que el TNF- $\alpha$ , está presente en RNAm en células CD34+ (Janowska et al, 2001), sin embargo en esta tesis no se encontró presencia basal en las células progenitoras 32D, y sólo  $\alpha$ -caseína es capaz de inducir hasta 0.405 ng/mL de TNF- $\alpha$ . Es de resaltar que  $\alpha$ -caseína por si sola no

---

---

es responsable del concluyente efecto que muestra el CasNa induciendo la expresión hasta 2.19 mg/mL (Ver Tabla 2).

Ante esta situación sería interesante, ensayar si la adición simultánea de las tres caseínas tenga un efecto aditivo que resulte en la magnitud total de mayor efecto observado con la molécula de CasNa, o bien con dos caseínas a la vez, con el objetivo de localizar cual combinación de caseínas sean las responsables para inducir la producción de cada citocina, con lo que se pudiera estar avanzando en el desciframiento del mecanismo de señalización que media los efectos sobre la proliferación de las células 32D del CasNa, lo mismo se debe hacer para las células WEHI-3.

Resumiendo, con este trabajo de tesis queda de manifiesto que las caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , al igual que CasNa inhiben la proliferación de la línea celular multipotencial hematopoyética 32D de ratón; que este proceso es mediado a través de la inducción y liberación de TNF- $\alpha$  (Figura 5). En cuanto al mecanismo de acción por el que se inhibe proliferación, e induce diferenciación, esta tesis muestra que es a través de  $\alpha$ -caseína, la porción de la molécula CasNa que induce la liberación de TNF- $\alpha$  que inhibe la proliferación de las células 32D, a la vez que podría ser el responsable de la inducción a su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago. Por otro lado, aunque las caseínas inhiben la proliferación de las células leucémicas WEHI-3, aún se desconoce como lo hacen.

Nombre de archivo: A8  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: MATERIALES Y MÉTODO  
Asunto:  
Autor: Jouis  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:36 A.M.  
Cambio número: 3  
Guardado el: 14/11/07 02:53 A.M.  
Guardado por: Jouis  
Tiempo de edición: 4 minutos  
Impreso el: 02/01/01 04:33 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 19  
Número de palabras: 4,128 (aprox.)  
Número de caracteres: 23,534 (aprox.)

---

---

## CONCLUSIONES.

La  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína suprimen la proliferación de 32D y WEHI, e inducen diferenciación sólo de las células 32D sin afectar la viabilidad celular.

Alfa caseína induce la producción de TNF- $\alpha$ , sólo en las células 32D.

Debido a que los resultados no muestran secreción de citocina TNF- $\alpha$  en la línea celular WEHI-3, se desprende que esta línea no sigue el mismo mecanismo de inhibición de proliferación que la línea celular 32D y que el TNF- $\alpha$  no participa en la inhibición de la proliferación de WEHI-3.

TNF- $\alpha$  es el responsable de la inhibición a la proliferación en células 32D tratadas con  $\alpha$ -caseína.

---

---

## PERSPECTIVAS

Después de encontrar que la inhibición a la proliferación de células 32D es por la inducción de la secreción de TNF- $\alpha$  que actúa sobre las mismas células, sólo por la acción de TNF- $\alpha$ , surgen muchas dudas que deben ser respondidas.

Una de ellas es que si el mayor efecto inhibitorio de la proliferación de 32D se observa con CasNa, mas que con  $\alpha$ -caseína; además de que si bien,  $\alpha$ -caseína es la única de las tres caseínas que produce citocina TNF- $\alpha$ , la cantidad producida no es el total de proteína producida por efecto de CasNa. Por lo tanto, sería interesante probar aquellas caseínas restantes o bien, si la combinación por pares o de las tres caseínas al mismo cultivo resulta en un efecto sumatorio de producción total de citocina que sea más cercana al efecto observado en CasNa.

Por otro lado, ya que se observó que WEHI-3 no responde significativamente a la diferenciación celular por efecto de caseínas, sería conveniente indagar cual es el mecanismo de acción que esta frenando la proliferación celular en estas células.

De igual manera, una vez esbozado que las células 32D responden en diferentes maneras a la adición de CasNa o caseínas a las líneas celulares, o incluso en experimentos in vivo (datos no mostrados de nuestro grupo de trabajo), resultaría obvio esperar que estas células y todas aquellas que tienen una respuesta a moléculas derivadas de la caseína poseen un receptor putativo a esta molécula, que después de la interacción receptor-ligando ejercen todas las actividades que se han venido observando en diferentes evaluaciones. El hallazgo, caracterización e identificación de este receptor, redituaría en la posible modulación del mismo en aquellas células que no son del todo responsivas a los tratamientos con caseína y sus derivados, y obligarlas de esta manera a diferenciarlas, modular su proliferación o la secreción de diferentes citocinas y factores de crecimiento celular.

Nombre de archivo: A9  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: CONCLUSIONES  
Asunto:  
Autor: Jouls  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:38 A.M.  
Cambio número: 2  
Guardado el: 14/11/07 02:45 A.M.  
Guardado por: Jouls  
Tiempo de edición: 1 minuto  
Impreso el: 02/01/01 04:33 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 2  
Número de palabras: 368 (aprox.)  
Número de caracteres: 2,098 (aprox.)

## **BIBLIOGRAFÍA.**

Aiyer R, Aggarwal B. (1998). Tumor necrosis factors. Handbook on cytolytic lymphocytes and complement: effectors of the immune system. Ed. Boca Raton Press, Florida. 132 pp.

Aschkenasy A (1971). Comparative effects of casein and various mixtures of amino-acids on the restoration of erythropoiesis, neutropoiesis and lymphopoiesis in rats prepared by a prolonged protein deprivation. New studies. Arch Sci Physiol. 25: 415.

Beutler B, Cerami A. (1989). The biology of cachectin/TNF. A primary mediator of the host response. Annu Rev Immunol 7: 625.

Beyert R, Fiers W. (1998). Tumor necrosis factor and lymphotoxin. (Edit.) Mire-Sluis A. and Thorpe R. Cytokines. Ed. Academic Press Inc. San Diego. 335pp

Bharat B, Jordan U. (1992). Human cytokines. Ed. Blackwell Scientific Publications, London 405 pp.

Bigas A, Martin D, Milner L. (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. Mol Cell Biol 18: 2324.

Blackx B, Broeders L, Bot F, Lowenberg B. (1991). Positive and negative effects of tumor necrosis factor on colony growth from highly purified bone marrow progenitors. Leukemia 5: 66.

Boosalis M, Ikuta T, Pace S, da Fonseca S, White L, Faller V, Perrine P. (1997). Abrogation of IL-3 requirements and stimulation of hematopoietic cell proliferation in vitro and in vivo by carboxylic acids. Blood Cell Mol Dis 23: 434.

Broxmeyer H, Williams E, Lu L, Cooper S, Anderson L, Hoffman R, Rubin Y. (1986). The suppressive influences of human tumoral necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cell from donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon- $\gamma$ . J Immunol 136: 4487.

Bruno L, Hoffmann R, McBlane F, Brown J, Gupta R, Joshi C, Pearson S, Seidl T, Heyworth C, Enver T. 2004. Molecular signatures of self-renewal, differentiation, and lineage choice in multipotential hemopoietic progenitor cells in vitro. Mol Cell Biol. 24(2):741.

Caux C, Saeland S, Favre C, Dubert V, Mannoni P, Banchereau J. (1990). Tumor necrosis factor-alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitors cells. Blood 75: 2292.

Chen CC, Grimbaldston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ. (2005) Identification of mast cell progenitors in adult mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(32):11408.

Clark S, Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236: 1229.

Cluitmans FH, Esendam BH, Landegent JE, Willemze R, Falkenburg JH. (1995). Constitutive in vivo cytokine and hematopoietic growth factor gene expression in the bone marrow and peripheral blood of healthy individuals. *Blood* 85(8):2038-44.

Coulombel L. (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene*. 23: 7210.

Davies, D and Law E. (1980). The composition of Whole casein from the milk of Ayrshire cows. *J. Dairy Res.* 44:447.

Davis J, Narachi M, Alton K, Arakawa T. (1987). Structure of human tumor necrosis factor- $\alpha$  derived from recombinant DNA. *Biochem*26: 1322.

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

Degliatoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis B, Perussia G, Trinchieri G. (1985). Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony inhibiting activity and NK cytotoxic factor: relationship with tumor necrosis factor and synergy with immune interferon. *J Exp Med* 162: 1512.

Digel W, Stefanic M, Schoniger W, Buck C, Raghavachar A, Frichhofen N, Heimpel H, Porzolt F. (1989). Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 73: 1242.

Fenaux P, Chomienne C, Degos L. 2001. Treatment of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 14(1):153.

Fransen L, Ruyschaert M, der Hieden W. (1986). Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. *Cell Immunol* 100: 260.

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

functional assays. *Oncogene*. 23(43):7210.

Greenberger J, Sakakeeny M, Humphries R, Eaves C, Eckner R. (1983). Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2931.

Godin I, Dieterien-Lievre F, Cumano A. (1995). Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days post coitus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:773.

Grooten J, Goosens V, Vanhaesebroeck B, Fiers W. (1993). Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. *Cytokine* 5: 546.

- Hamblin A. (1993). Cytokines and cytokine receptors. Ed. IRL Press Oxford University Press, London. 90 pp.
- Harris K, Hu X, Schultz S, Arcasoy M, Forget B, Clare N. (1998). The distal cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor induces granulocytic differentiation in 32D cells. *Blood* 92: 1219.
- Hu C, Chien L. (1998). The cytoplasmic domain of stem cell antigen CD34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling. *Blood* 91: 1152.
- Hughes-Jones N, Wickramasinghe E. (1991). Lecture notes on haematology. Ed. Blackwell Scientific Publications, London. 225 pp.
- Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim H, Kawakami M, Akiyama T, Kishimoto T, Sugiyama H. (1998). Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 91: 2969.
- Jacobsen S, Ruscetti F, Ortiz M, Gooya J, Keller J. (1994). The growth response of Lin-Thy-1+ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy of multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. *Exp Hematol* 22: 985.
- Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak M. (2001). Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem cells* 19: 99.
- Jones E, Stuart D, Walker N. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338:225.
- Jue D, Sherry B, Luedke C. (1990). Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochem* 29: 8371.
- Keykdal S, Abboud C, Liesveld J (1999). Effect of nitric oxide production and oxygen tension on progenitor preservation in ex vivo culture. *Exp Hematol*. 27: 441.
- Koletzko B, Aggett P, Bindels J, Bong P, Ferre P. (1998). Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British J Nutrition* . 80: S5.
- Kon S. La leche y los productos lácteos en la nutrición humana. 2da. ed. FAO, Rumania, 1977.
- Koyasu S, Yodoy J, Nikaido T, Tagaya Y, Taniguchi Y, Honjo T, Yahara, I. (1996). Expression of interleukin 2 receptors on interleukin 3-dependent cell lines. *J Immunol* 138: 478.
- Kreider B, Phillips D, Prystowsky B, Shirsat N, Pierce H, Tushinski R, Rovera G. (1990). Induction of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor by granulocyte CSF increases the differentiative options of a murine hematopoietic progenitor cell. *Mol Cel Biol* 10: 4846.

Kriegler M, Perez C, DeFay K. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45.

Kumosinski T, Brown E, Farrell H. (1991). Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: kappa casein. *J Dairy Sci.* 74: 2879.

Lange W, Brugger F, Rosenthal L, Kanz A, Lindemann A. (1991). The role of cytokines in oncology. *Int J Cell Cloning* 9: 252.

Ledesma E, Martinez I, Cordova Y, Rodriguez-Sosa M, Monroy A, Mora L, Soto I, Ramos G, Weiss B, Santiago Osorio E (2004). Interleukin-1 beta (IL-1beta) induces tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) expression on mouse myeloid multipotent cell line 32D cl3 and inhibits their proliferation. *Cytokine.* 26:66.

Ledesma E. (2006). Participación de inhibidores hematopoyéticos en el bloqueo de la proliferación de la línea celular mielóide multipotencial 32D de ratón tratada con caseinato de sodio (CasNa). Tesis de Maestría. FES-ZARAGOZA, UNAM.

Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. (1998). Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol.* 10(5):573-80.

Li J, Koay D, Xiao H, Sartorelli A. Regulation of the differentiation of WEHI-3BD+ leukemia cells by Granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Cell Biol;* 1993; 120:1481-1489.

Lonnerdal B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 77(6):1537S-1543S.

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

Lowenthal W, Castla E, Christiansen J, Schreurs J, Rennick D, Arai N, Hoy P, Takebe Y, Howard M. (1988). Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hematopoietic and non-hematopoietic cells. *J Immunol* 140: 456.

Lu L, Heinrich M, Wang L, Dai M, Zigler A, Chai L, Broxmeyer H. (1999). Retroviral-mediated gene transduction of c-kit into single hematopoietic progenitor cells from cord blood enhances erythroid colony formation and decreases sensitivity to inhibition by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1. *Blood* 7: 2319.

Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska A, Gewirtz M, Emerson S, Ratajczak M. (2001). Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblast, erithroblast, and megakaryoblast and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 9

Martinez-Jaramillo G, Flores-Figueroa E, Gómez-Morales E, Sánchez-Valle E, Mayani H. (2001). Tumor necrosis factor-alpha levels in long-term marrow cultures from patients with aplastic anemia: modulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Hematol* 3:144.

Melo B. (2004). Modulación de la expresión de genes del Inaje monocito-macrófago (FcγR, M-CSF, GM-CSF, y sus receptores) en células mieloides tratadas con caseínas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

Metcalf D. (1980). Clonal extinction of myelomonocytic leukemic cells by serum from mice injected with endotoxin. *Int J Cancer*.25(2):225.

Metcalf B. (1985). Multi-CSF-depend colony formation by cells of a murine hematopoietic cell line: specificity and action of multi-CSF. *Blood* 65: 357.

Metcalf D. (2007a). On hematopoietic stem cell fate. *Immunity*.26(6):669.

Metcalf D. (2007b). Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells*. 25(10):2390.

Migliaccio G, Migliaccio A, Kreider B, Rovera G, Adamson J. (1989). Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at differentiation from the murine cell line 32D. *J Cell Biol* 109: 833.

Morrison S, Uchida N, Weissman I. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 35.

Munker R, Hiller E, Paquette R. (1998). *Modern hematology. Biology and clinical management*. Ed. Human Press, New Jersey. 369 pp

Murphy M, Perussia B, Trincheri G. (1988). Effects of recombinant tumor necrosis factor, lymphotoxin, and immune interferon on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 16: 131.

Negrier M, Pourreau C, Palem P. (1992). Phase I trial of recombinant interleukin-2 followed by tumor necrosis factor in patients with metastatic cancer. *J Immunother* 11: 93

Neta R, Oppenheim J, Douches D. (1988). Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 140: 108.

Ogawa M, Matsunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Annu Acad Sci* 872: 17.

Ogawa M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844.

Okano M, Ohnota H, Sasaki R (1992). Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J Nutr.* 122:1376.

Orkin S. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270: 4955.

Orlic D, Bodine D. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up? *Blood* 84: 2991.

Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Friego G. (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 2: 71.

Pennica D, Nedwin G, Hayflick J, Seeburg P, Derynck R, Palladino M, Kohr W, Aggarwal B, Goeddel D. (1984). Human tumor necrosis factor. Pre-cursor structure, expression, and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724.

Perez C, Albert I, De Fay K. (1990). A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell to cell contact. *Cell* 63:251.

Pérez J y Pérez JP. (1984) *Bioquímica y microbiología de la leche*. Limusa. México. 202 pp.

Pessi T, Isolauri E, Sutas Y, Kankaanranta H, Moilanen E, Hurme. (2001). Suppression of T-cell activation by *Lactobacillus rhamnosus* GG-degraded bovine casein. *Int Immunopharmacol* 1:211-8.

Pluznik D, Sachs A. (1965) The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66: 319.

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

Ramos Mandujano Gerardo. (2004). Efecto de caseínas y casomorfina en la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mieloides 32D y WEHI-3. Tesis de Doctorado. FES Zaragoza, UNAM.

Ramos G, Santiago E, Martinez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B (2000). Sodium caseinate induces differentiation of 32D pluripotential hematopoietic cells. *Rev Invest Clin.* 52:638.

Ramos G, Weiss B, Cordova Y, Hernandez J, Zambrano I, Santiago E (2004). Sodium caseinate induces expression and secretion of murine multipotent myeloid cell line 32D macrophage colony-stimulating factor. *Arch Med Res.* 35:109.

Sanchez X, Suetomi K, Cousins-Hodges B, Horton K, Navarro J. (1998). CXC chemokines suppress proliferation of myeloid progenitor cells by activation of the CXC chemokine receptor 2. *J Immunol* 160: 906.

Santiago E, Mora L, Montesinos J, Ventura J, Machuca C, Mendoza J. (1994). Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblast. *Rev Inv Clin (Suppl) I*: 253.

Schmid D, Tite J, Ruddle N. (1986). DNA fragmentation: manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting supernatant. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1881.

Sidhu R, Bollon A. (1993). Tumor necrosis factor activities and cancer therapy. A perspective. *Parmacol Ther* 57: 79.

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

Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 2003; 10:9-16  
Smith R, Baglioni C. (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 262:6951.

Sugarman B, Aggarwal B, Hass P, Figari I, Palladino M, Shepard H. (1985). Recombinant human necrosis factor alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 293.

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

Tracey K, Cerami A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med* 45: 491.

Tsao J, Tojo A, Fukamachi H, Kitamura T, Saito T, Urabe A, Takaku F. (1988). Expression of the functional erythropoietin receptors on interleukin 3-depend murine cell lines. *J Immunol* 140: 89.

Valtieri M, Tweardy D, Caracciolo D, Jhonson K, Mavilio F, Altman S, Santoli D, Rovera G. (1987). Cytokine-dependent granulocytic differentiation. *J Immunol* 11: 3829.

Vilcek J, Palombella V, de Stephamo D, Swenson C, Feinman R, Hirai R, Tsujimoto M. (1986). Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 163: 1632.

Walstra P, Jenners R. (1984) Dairy chemistry and physics. Ed. Jhon Wiley Sons, New York, USA. 106 pp.

Wong C, Seow H, Liu A, Husband A, Smithers G, and Watson D (1996). Modulation of immune responses by bovine beta-casein. *Immunol Cell Biol.* 74: 323.

Xu D, Yoder M, Sutton J, Hromas R. (1998). Forced expression of Genesis, a winged helix transcriptional repressor isolated from embryonic stem cells, blocks granulocytic differentiation of 32D myeloid cells. *Leukemia* 12: 207.

Yamaguchi M, Nadler S, Lee J, Deeg H. (1999). Induction of negative regulators of haematopoiesis in human bone marrow cells by HLA-DR cross-linking. *Transpl Immunol* 3: 159.

Zambrano-Ramírez IR, Santiago-Osorio E, Weiss-Steider B, Cáceres-Cortes JR. (1999). Biology of hematopoietic stem cells *Rev Invest Clin.* 1999;51(1). 53-68.

Zhu J and Emmerson S. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene.* 21:3295.

Nombre de archivo: A11  
Directorio: E:\IMPRESION DISCOS mas cd sin etiqueta mas  
impreso\DOC  
Plantilla: C:\WINDOWS\Application  
Data\Microsoft\Plantillas\Normal.dot  
Título: BIBLIOGRAFÍA  
Asunto:  
Autor: Jouis  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 14/11/07 02:40 A.M.  
Cambio número: 1  
Guardado el: 14/11/07 02:41 A.M.  
Guardado por: Jouis  
Tiempo de edición: 1 minuto  
Impreso el: 02/01/01 04:34 A.M.  
Última impresión completa  
Número de páginas: 8  
Número de palabras: 2,518 (aprox.)  
Número de caracteres: 14,353 (aprox.)