



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO DEL EFECTO DEL CASEINATO DE
SODIO (CasNa) SOBRE LA PROLIFERACIÓN
Y DIFERENCIACIÓN DE LAS LÍNEAS
CELULARES MIELOIDES J774 Y P388
DE RATÓN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A
ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MÉXICO, D.F.

Noviembre, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, UIDCC, en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, (UMIEZ), FES-Zaragoza, UNAM. Bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio y con el apoyo de la DGAPA, UNAM PAPIIT (IN217407).

Dedicatoria

A Dios

A mis padres por su apoyo, amor y comprensión.

A Angelito por darme la fortaleza de seguir adelante.

A mis hermanos Cesar y Gustavo por su apoyo.

A mi sobrino Marco Antonio por darme su cariño y paciencia.



Agradecimientos

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por brindarme su apoyo y amistad, así como darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Edelmiro Santiago, al M. en C. Edgar Ledesma, a la M. en C. Yolanda Córdova, al Biol. Oswaldo Silvestre, por tenerme la paciencia para guiar mis pasos en la Hematopoyesis.

Al QFB. Adrián Solís, por su colaboración en el trabajo experimental.

A la Dra. Lourdes Mora y al Dr. Rubén Marroquí, por darme las facilidades de utilizar su equipo.

A todos los integrantes del laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, por darme su apoyo y tenerme paciencia, gracias por hacer ameno cada día de trabajo.

A Belem por brindarme tu amistad incondicional así como tu confianza cuando más lo necesitaba.

A todas aquellas personas que me han apoyado y acompañado a lo largo de mi carrera.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Marco Teórico.....	4
Hematopoyesis.....	4
Factores de crecimiento hematopoyético.....	10
Desequilibrio hematopoyético.....	11
Líneas celulares.....	15
Biomoléculas activadoras de la hematopoyesis.....	16
Caseínas.....	17
Planteamiento del problema.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	23
Materiales y Métodos.....	24
Resultados.....	31
Discusión de Resultados.....	48
Conclusiones.....	52
Perspectivas.....	53
Bibliografía.....	54
Apéndice.....	65
Publicaciones y Congresos.....	68

RESUMEN

El caseinato de sodio es una sal de la caseína, molécula que además de sus propiedades nutricionales, es ampliamente usada en la investigación biomédica, particularmente en los estudios de inflamación, pero recientemente se ha mostrado que inhibe la proliferación e induce la diferenciación de la línea hematopoyética multipotencial de ratón 32D, y también inhibe la proliferación de la línea leucémica mielomonocítica de ratón WEHI-3, pero se desconoce si inhibe la proliferación e induce diferenciación en líneas leucémicas monocíticas. En este trabajo, usando como modelos de estudio a las líneas leucémicas monocíticas de ratón J774 y P388, se encontró que la adición de CasNa, en forma dosis dependiente inhibe la proliferación de ambas líneas leucémicas. El uso de albúmina como proteína irrelevante no inhibe la proliferación, mientras que la adición de hidrolizado de caseína la inhibe parcialmente. La sobrevivencia revelada por ensayos de MTS, solo es afectada en forma significativa, pero existe un efecto citotóxico en forma dosis dependiente después de la adición de CasNa y en menor medida por el HC, mientras que la albúmina prácticamente no tiene efecto. Las células teñidas con Wright y observadas bajo el microscopio revelan que el CasNa y el HC inducen diferenciación morfológica de formas monoblásticas hacia monocito-macrófagos, mientras que la albúmina no afecta a ninguna de las líneas celulares. Acompañando a la diferenciación existe un aumento en la actividad fagocítica solo en células con presencia de CasNa, mientras que HC y albúmina no revelan activación.

MARCO TEÓRICO

Hematopoyesis

Diariamente miles y millones de células sanguíneas maduras, mueren y son eliminadas en circulación desempeñando sus funciones, como los eritrocitos que se encargan del transporte de oxígeno, las plaquetas en la coagulación, las células blancas como granulocitos, monocitos y linfocitos en la defensa contra agentes patógenos (Zambrano *et al.*, 1999). Como respuesta un número equivalente de células son producidas para ser enviadas a la circulación. A este proceso continuo de generación de células sanguíneas es conocido como hematopoyesis (haima-sangre; poyesis-producción) (Orkin, 1995), manteniendo así un equilibrio en el individuo.

La producción de células sanguíneas en el humano inicia durante los primeros 14 a 19 días de vida embrionaria; hoy en día se piensa que este proceso se inicia durante la embriogénesis a partir de células mesodérmicas capaces de generar tanto células hematopoyéticas como endoteliales: hemangioblastos. La primera localización es extraembrionaria, en los islotes sanguíneos del saco vitelino, en este momento la hematopoyesis se caracteriza por restringirse a la producción de eritrocitos nucleados cargados con hemoglobina embrionaria. Posteriormente la hematopoyesis tiene una localización intraembrionaria, primero en la esplacnopleura paraaórtica y luego en la región aorta-gónada-mesonefro (AGM) (Baron, 2003), donde se considera que se especializan las células tallo hematopoyéticas (HSC; hematopoietic stem cell) (Sánchez *et al.*, 1996), células que tienen la capacidad de dar origen a todo el linaje de células sanguíneas (Ogawa, 1993). Después de desarrollarse la circulación sanguínea, las células del saco vitelino migran hacia el hígado, timo y el bazo fetal,

convirtiéndose en los principales órganos hematopoyéticos en el segundo trimestre de desarrollo (Toles *et al.*, 1989), finalmente la actividad hematopoyética pasa a la médula ósea hacia el tercer trimestre (Yorder, 2001), siendo el principal sitio hematopoyético en el individuo después del nacimiento. En los primeros cuatro años de vida, la médula ósea de todos los huesos contribuye a la hematopoyesis (Munker *et al.*, 1998), posteriormente, en la etapa adulta debido al incremento de células adiposas en ciertas regiones de la médula, el proceso queda restringido fundamentalmente en las epífisis de los huesos largos (fémur y húmero), así como los huesos pélvicos, columna vertebral, el cráneo y el esternón (Hughes-Jones & Wickramasingh, 1991).

Examen celebrara

En cada uno de los órganos hematopoyéticos las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente específico constituido por distintos tipos de células y proteínas extracelulares denominado microambiente hematopoyético (Prosper *et al.*, 2001). En la médula ósea, el microambiente hematopoyético está constituido por fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipocitos (todos ellos denominados células del estroma medular) (Metcalf, 1998; Kaushansky, 2006). Dichas células producen y secretan diversos tipos de proteínas conocidas como citocinas, las cuales desempeñan papeles fundamentales en la proliferación, sobrevivencia, autorrenovación, migración y diferenciación de las células hematopoyéticas, tanto del linaje mieloide: eosinófilos, basófilos, neutrófilos, granulocitos, monocito-macrófagos, megacariocitos y eritrocitos; como del linaje linfoide: células NK, linfocitos T y B (Figura 1). La producción de proteínas es desarrollada mediante tres mecanismos: en primer lugar, las células del estroma medular secreta proteínas que constituyen la matriz extracelular como la colágena, fibronectina, laminina, entre otros (Zuckerman, 1989); en segundo lugar, estas células producen proteínas denominadas citocinas, las cuales regulan la fisiología de las células

sanguíneas y sus precursores (Moore, 1991; Metcalf, 1993). Finalmente mediante el contacto célula-célula a través de moléculas de adhesión y morfógenos. De esta manera, el microambiente hematopoyético, proporciona las condiciones necesarias para que la hematopoyesis se lleve a cabo de manera equilibrada.

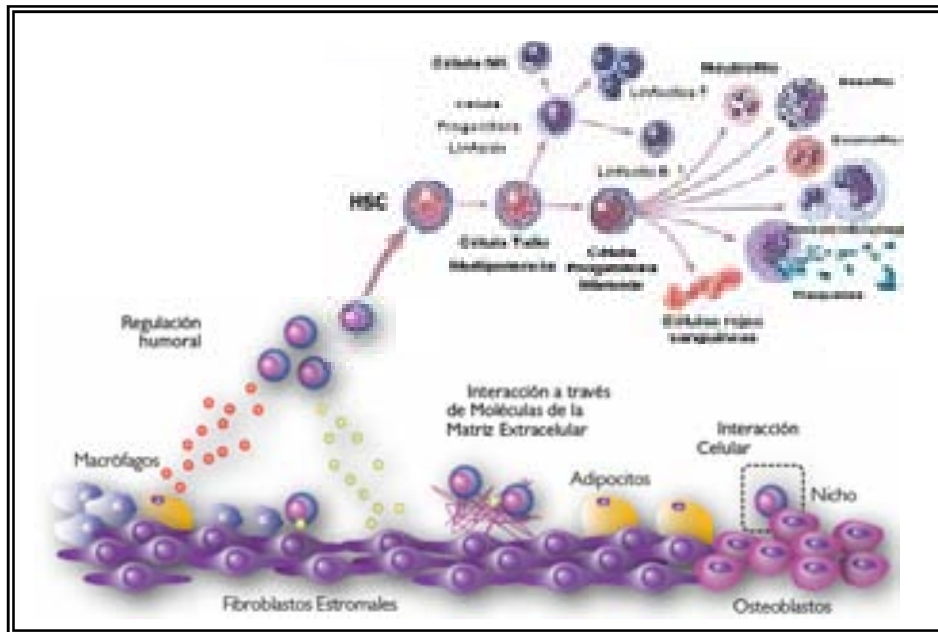


FIGURA 1.- Micro ambiente hematopoyético tomado y modificado de Mayani *et al.*, 2007.

El mantenimiento de la hematopoyesis se fundamenta en la proliferación y diferenciación de un grupo de células conocidas como células tallo hematopoyéticas (HSC) (Orkin, 1995), las cuales se concentran principalmente en el estroma de la médula ósea constituyendo el 0.05% de la población celular (Ogawa & Matsunaga 1999; Orlic & Bodine, 1994), que presentan tres características básicas: la primera: son multipotentes, es decir que tienen la capacidad de generar todos los linajes sanguíneos (Morrison *et al.*, 1995); la segunda: tienen un alto potencial proliferativo, por tanto son capaces de dividirse y producir un número de células maduras durante toda la vida del individuo; tercero: tienen la capacidad de generar nuevas células madre idénticas, manteniendo una división de tipo simétrico, capacidad conocida como

auto-renovación; característica única de estas células, además carecen de características morfológicas o histoquímicas propias de las células maduras o comprometidas hacia algún linaje celular (Hoffman *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 2002).

Durante el curso de la hematopoyesis las HSC se comprometen a un "programa de diferenciación", esto es, restringen su potencial de diferenciación hasta generar un sólo tipo de célula madura, en un proceso jerárquico que usualmente se considera irreversible. Para ello las HSC de acuerdo a su capacidad de autorrenovación se dividen en dos grupos de células tallo, hematopoyéticas a largo plazo (LT-HSC, long-term hematopoietic stem cell), las cuales tienen la capacidad de autorrenovarse indefinidamente y se mantienen quiescentes o ciclando lentamente; y células HSC reconstituyentes a corto plazo (ST-HSC, short-term hematopoietic stem cell), quienes sólo pueden autorrenovarse por aproximadamente 8 semanas y se encuentran activamente ciclando (Weisman, 2000; Passegue *et al.*, 2005). Las ST-HSC dan origen a los progenitores multipotentes (MPPs, multipotent progenitors) quienes presentan completa actividad de diferenciación pluripotente pero han perdido su capacidad de autorrenovación (Adolfsson *et al.*, 2001). De la proliferación y diferenciación de los MPP descienden las células progenitoras mieloides y las células progenitoras linfoides (Hao *et al.*, 2001). A esta serie de comprometimiento y diferenciación secuencial de la hematopoyesis, puede ser distinguida mediante el análisis del tipo de colonias generadas en cultivo *in vitro*. De esta manera es posible distinguir a las células primitivas con la capacidad de formar colonias en cultivo semisólido, conocidas como unidades formadoras de colonias (CFU). Dentro del linaje mielóide se encuentran: unidades formadoras de colonias mixtas o multipotenciales (CFU-GEMM) integradas por granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos; colonias bipotenciales (CFU-GM) formadas sólo por granulocitos y macrófagos, o bien

células unipotenciales con la capacidad para generar un sólo tipo de colonia y representada por las unidades formadoras de colonias de eritrocitos (CFU-E), granulocitos (CFU-G) y macrófagos (CFU-M) (Quesenberry *et al.*, 2002; Metcalf, 1999). Finalmente, las células maduras presentes en la circulación sanguínea, constituyen el último estadio de diferenciación de los elementos hematopoyéticos, siendo posible identificarlas mediante características morfológicas y funcionales (Munker, 2000), como se observa en la Figura 2.

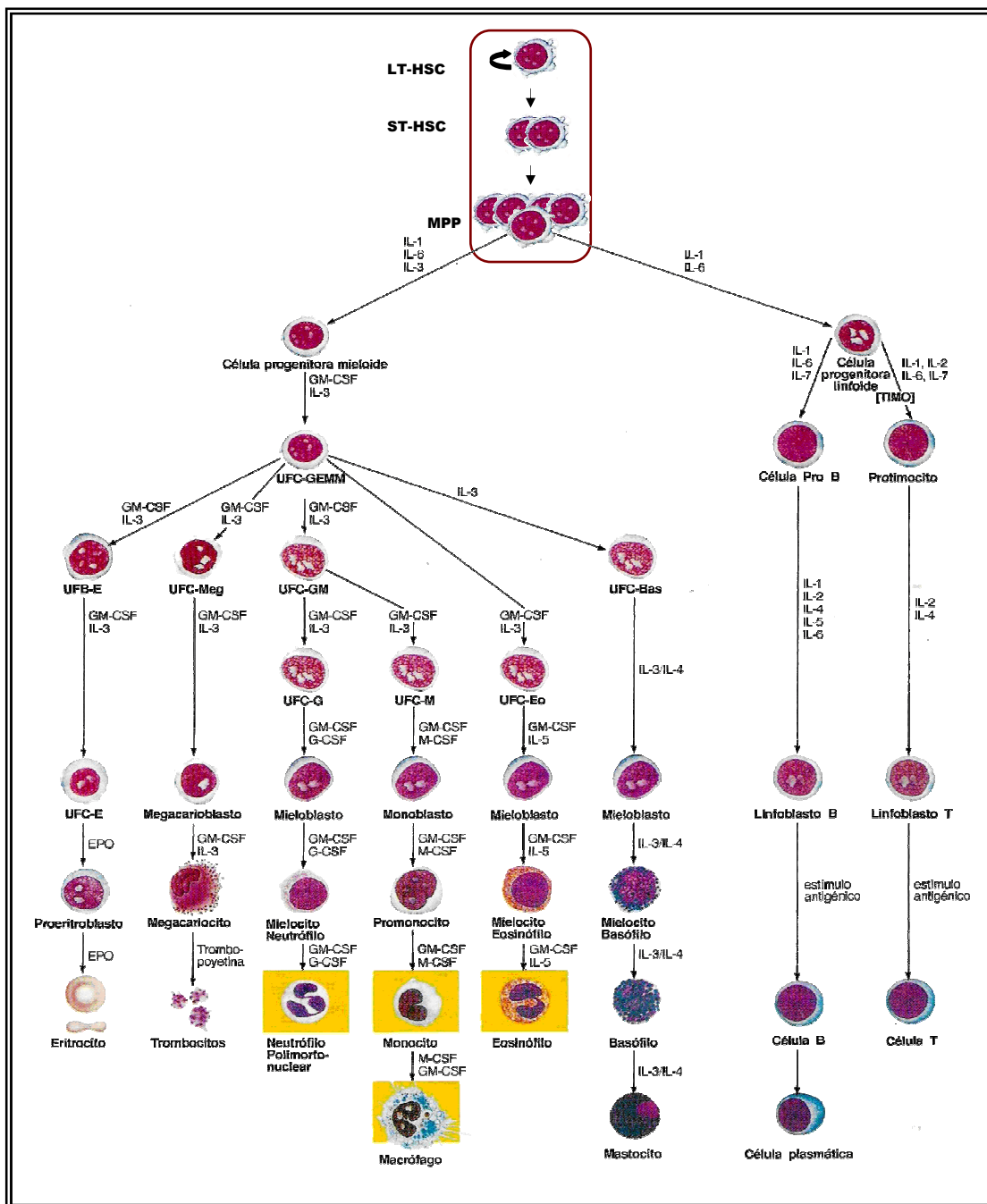


FIGURA 2. Modelo de la hematopoyesis (Tomado y modificado de Schering Plough- SANDOZ)

Dentro de la línea de células mieloides el linaje monocito-macrófago representa células importantes, por que conectan al sistema inmune natural con el sistema inmune específico. En este la reacción a cambios en el balance homeostático inducido por una infección, caracterizada por una serie de eventos muy complejos, pero cuidadosamente orquestados. Las células involucradas en este proceso se comunican entre ellas y/o con el ambiente celular por medio de redes multidireccionales de señales biológicas (interacciones, producción de modificadores biológicos como citocinas), que inducen, amplifican o suprimen respuestas particulares. Entre las células involucradas en este proceso, se encuentra una célula muy importante: el macrófago, que junto con los monocitos circulantes, forman el sistema fagocítico mononuclear, considerado como uno de los sistemas fagocíticos más importantes del organismo (Nacy *et al.*, 1988, Rojas & Arce, 2003). Los macrófagos se originan a partir de las células HSC presentes en médula ósea, quienes dan origen a la CFU-GM progenitores que forman colonias en cultivos *in vitro* de médula ósea (Niato *et al.*, 1990; Ogawa, 1993;). A partir de la CFU-GM, los fagocitos mononucleares forman una línea celular que se inicia con el monoblasto quien da origen a los promonocitos, considerados los primeros precursores de los fagocitos mononucleares morfológicamente identificables (Van Furth, 1978, , Rojas & Arce, 2003); que a su vez originan a los monocitos, estos abandonan la médula ósea al azar para ponerse en circulación durante un tiempo aproximado de 17 h y después dejan este compartimiento para llegar a los tejidos donde maduran hacia macrófagos, representando el estado final de los monocitos maduros (Figura 3) (Becker *et al.*, 1987; Krause *et al.*, 1996). Los macrófagos morfológicamente se diferencian por tener mayor volumen celular, aumento en el número de gránulos citoplasmáticos, mayor heterogeneidad de la forma celular y un incremento en el número de vacuolas claras intracitoplasmáticas, un núcleo excéntrico fusiforme que contiene uno o dos nucleolos (Cohn, 1968; Meltzer *et al.*, 1982; . Los macrófagos juegan un papel muy importante en el funcionamiento del sistema inmunológico ya que constituyen la primera línea de defensa contra agentes extraños y controlan los procesos degenerativos eliminando células anormales, ya que tienen un alto poder fagocítico (Lewis & McGee, 1992; Rojas & Arce, 2003) , debido a que presentan receptores de superficie para las fracciones Fc de la inmunoglobulina G (IgG), además son células presentadoras de

antígenos, por tanto poseen moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (Gordon *et al.*, 1992; Henry *et al.*, 2004). Además una característica de los macrófagos es que manifiesta abundantemente antígenos CD 14 y CD68, los cuales se encuentran asociados a la endocitosis de agentes extraños como levaduras, virus, bacterias parásitos protozoarios y células tumorales (Holness *et al.*, 1993, Rojas & Arce, 2003). La habilidad de los macrófagos para participar en estas funciones no es constitutiva sino que se adquiere en respuesta a señales extracelulares; este proceso de desarrollo se conoce como activación y se define como la adquisición de la capacidad para llevar a cabo funciones citolíticas (Adams & Hamilton, 1989).

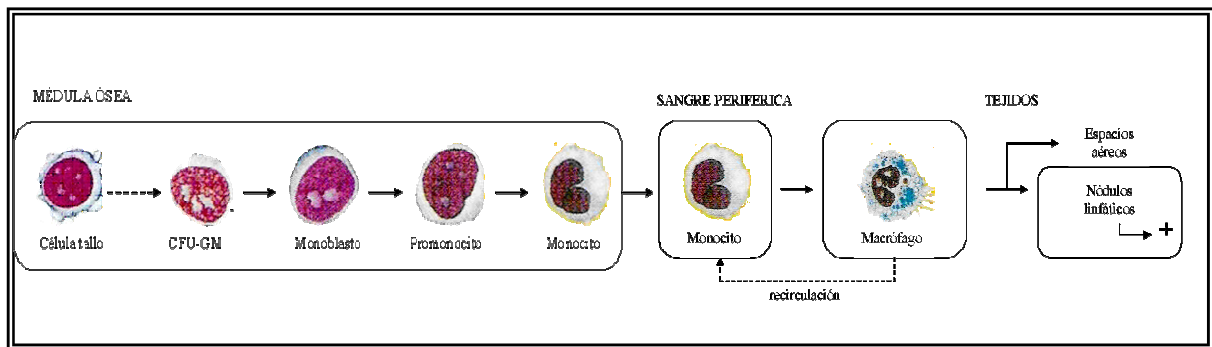


FIGURA 3. Representación esquemática del origen, desarrollo y destino de los macrófagos. Tomado y modificado (Van Furth & Sluiter, 1985).

Factores de crecimiento hematopoyético

Los factores de crecimiento hematopoyéticos son indispensables para la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de las células sanguíneas y se dividen en interleucinas (IL) y factores estimuladores de colonias (CSF, colony stimulating factors), los cuales en conjunto se les conoce como citocinas. Las características generales de estas citocinas incluyen: estructura glicoproteica de bajo peso molecular (Metcalf, 1998), tienen actividad *in vitro* e *in vivo* a bajas concentraciones, son producidas por diferentes tipos celulares, generalmente

actúan en más de un tipo celular y muestran efecto aditivo o sinérgico con otros factores de crecimiento para regular la proliferación y diferenciación de los diferentes linajes celulares sanguíneos (Figura 2). Los CSF modulan la expresión de genes reguladores y productores de citocinas, de manera que su mutación puede contribuir al desarrollo de una hematopoyesis anormal que termina en leucemia (cáncer de la sangre). Estos factores de crecimiento ejercen su efecto biológico al unirse a receptores específicos expresados en las células hematopoyéticas, los cuales son susceptibles de modulación durante el curso de la cascada hematopoyética (Metcalf y Burguess, 1982). Entre los principales factores de crecimiento hematopoyético se tienen: el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), de macrófagos (M-CSF) de granulocitos (G-CSF), la interleucina 3 (IL-3), eritropoyetina (Epo) (Figura 2). (Sieff, 1990; Dexter, 1989; Metcalf, 1993), los cuales son liberados al medio para cubrir la demanda en el organismo.

Desequilibrio de la hematopoyesis

El desequilibrio en la hematopoyesis se traduce en serios problemas hematológicos, por ejemplo en enfermedades neoplásicas incluidos los síndromes mielodisplásicos y los trastornos mieloproliferativos, el carácter distintivo de su crecimiento lo constituye la proliferación aberrante, de tipo clonal de las células que los originan (David, 2005; Horny *et al.*, 1990).

En México, para el 2006 se reportaron 63 888 muertes a consecuencia de algún tipo de cáncer, del cual el 12.8% corresponde a algún tipo de leucemia (boletín de estadísticas vitales, INEGI, 2008). La leucemia se caracteriza por un incremento excesivo en el número de células hematopoyéticas aberrantes presentes tanto en médula ósea como en sangre periférica, como resultado de una proliferación

desregulada y sin sentido de clones derivados de la transformación de células seminales o progenitoras. Las células leucémicas no son capaces de diferenciarse completamente o de funcionar adecuadamente, debido a que los mecanismos que controlan la proliferación y/o diferenciación se ven afectados, lo cual les confiere ventajas de crecimiento sobre las células que participan en la hematopoyesis normal (Figura 4) (Jandl, 1991; Cousar, 1999; Fong *et al.*, 2004). A este padecimiento se le considera como el cáncer de la sangre o leucemia la cual es originada en la médula ósea y de ahí se disemina a sangre periférica, bazo, ganglios y el resto de los tejidos.

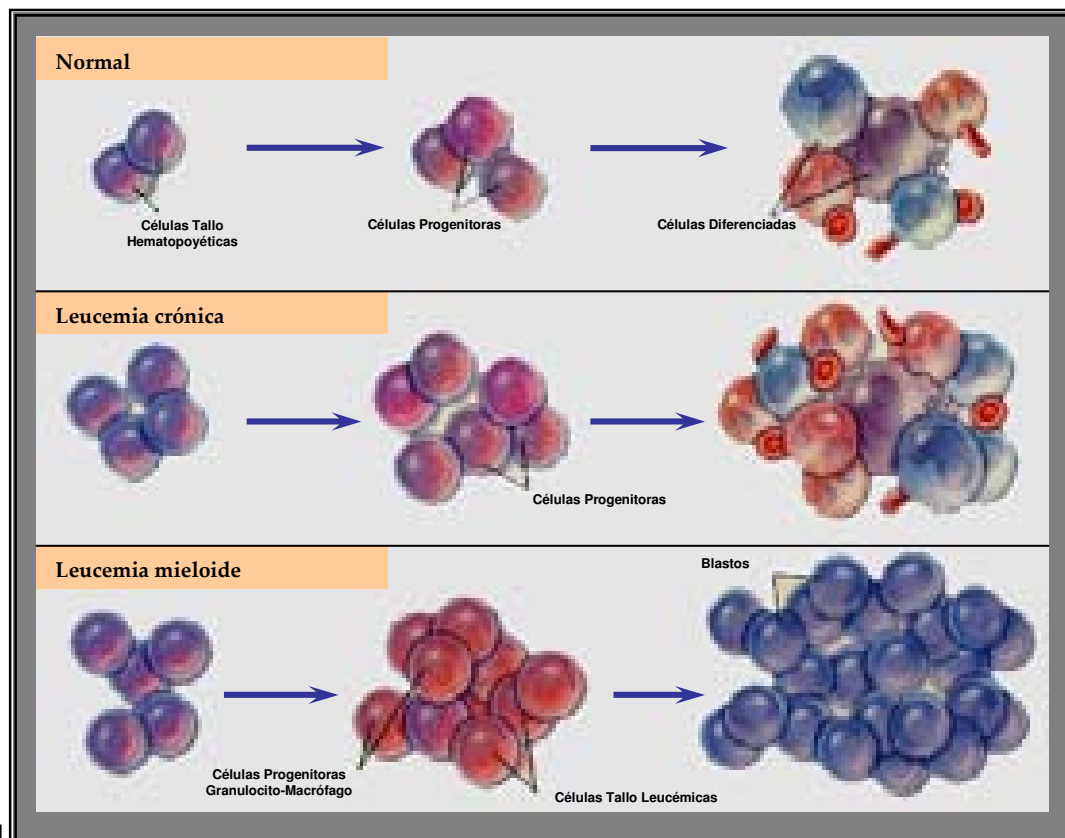


FIGURA 4.- Alteraciones de las células hematopoyéticas (tomado y modificado de Jamieson *et al.*, 2004.)

Las leucemias se dividen en dos grupos: Leucemias agudas y crónicas.

Las leucemias agudas son enfermedades caracterizadas por su evolución relativamente rápida y por la proliferación de células inmaduras denominadas “blastos” (Gutiérrez, 2006), puede ser ocasionada por una o varias mutaciones de una célula progenitora hematopoyética o bien de sus descendientes, activación de protooncogenes que muchas veces se acompaña de inactivación de uno o varios genes supresores, dando como resultado un aumento en la producción leucémica que un momento dado llega a desplazar a las células normales (Labardini, 2006), las leucemias agudas son consideradas neoplasias malignas de la infancia (39%), debido a la alta mortalidad que estas generan (51%) (Foon & Casciat, 2000; boletín de estadísticas vitales INEGI, 2008) aunque puede observarse a cualquier edad; las leucemias agudas pueden ser linfoblásticas “LAL” o mieloblásticas “LAM” de acuerdo al progenitor medular comprometido en el desarrollo maligno (Figura 5) (Hope *et al.*, 2003), de acuerdo con el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) se clasifican citomorfológicamente de la siguiente manera (tabla 1)

Linaje linfoide “LAL”	Linaje mieloide “LAM”
L1= linfoblastos pequeños	M0= indiferenciada
L2= linfoblastos grandes	M1= mieloblástica s/maduración
L3= Burkitoide	M2= mieloblástica c/maduración
	M3= promielocítica
	M4= mielomonoblástica
	M5a= monoblástica indiferenciada
	M5b= monoblástica diferenciada
	M6= eritroleucemia
	M7= megacarioblástica

Tabla 1: Clasificación citomorfológica de las leucemias agudas. Tomado y modificado de (Osorio, 1987).

Las leucemias crónicas se caracterizan por curso indolente, su larga evolución y por la ausencia de células inmaduras y anormales. Estas células interfieren en la producción de linfocitos y granulocitos que presentan características morfológicas similares pero no son funcionales, dificultando la lucha contra las infecciones, este tipo de leucemias se presenta principalmente en personas mayores de 50 años (Kantarjian *et al.*, 1988).

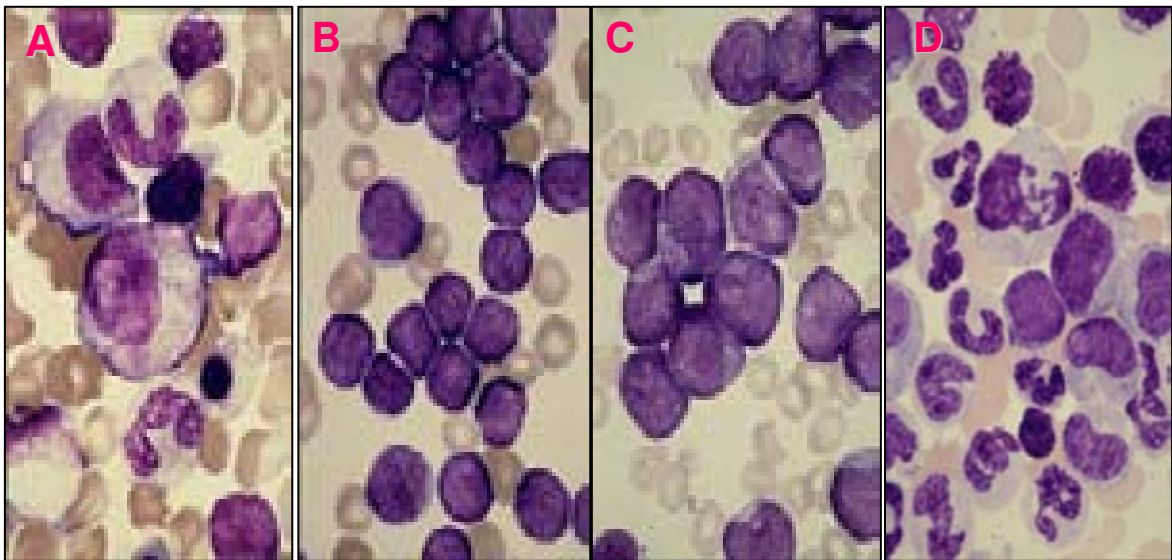


FIGURA 5.- Diferentes tipos de leucemias tomado y modificado de <http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/n50/disaster/Leukemia-E.html>

A : Médula ósea normal (control) granulocitos normales y eritroblastos.

B : Leucemia linfoide aguda ; Marcada proliferación de linfoblastos pequeños.

C : Leucemia mieloide aguda. Marcada proliferación de mieloblastos grandes.

D : Leucemia mieloide crónica. Marcada proliferación de granulocitos en varios estadios.

Líneas Celulares

El estudio de la hematopoyesis normal y anormal se ha facilitado gracias a la obtención de clones de líneas hematopoyéticas.

La línea celular macrofágica P388 de ratón, generadas en 1957 por Dawe y Potter mediante la inducción de metilcolantreno a un neoplasma linfoide proveniente de ratones DBA/2. Las cuales presentan características típicas de macrófagos, como la capacidad de adhesión, fagocitosis, vesículas lisosomales en el citoplasma, capacidad de formar rosetas lo que demuestra presencia de receptores Fc (Koren *et al.*, 1975), tienen capacidad de formar tumores malignos y secretar Interleucina 1 (IL-1) al medio estimuladas con lipopolisacarido (LPS) (Hirose *et al.*, 1985) presentan morfología promonoblástica (Figura 6a).

La línea celular macrofágica J774 es proveniente de un sarcoma (tumor macrofágico) que fue generado en una hembra de ratón BALB/c en 1968 mediante la inducción de plasmocitoma (Ralph *et al.*, 1975). Tiene la capacidad de formar tumores metastáticos; presentan receptores Fc e Ig, liberan al medio IL-1 y lisozima (LZM) (Ralph *et al.*, 1976), son inhibidas en presencia de LPS y sulfato dextrán, presentan morfología blástica (Figura 6b).

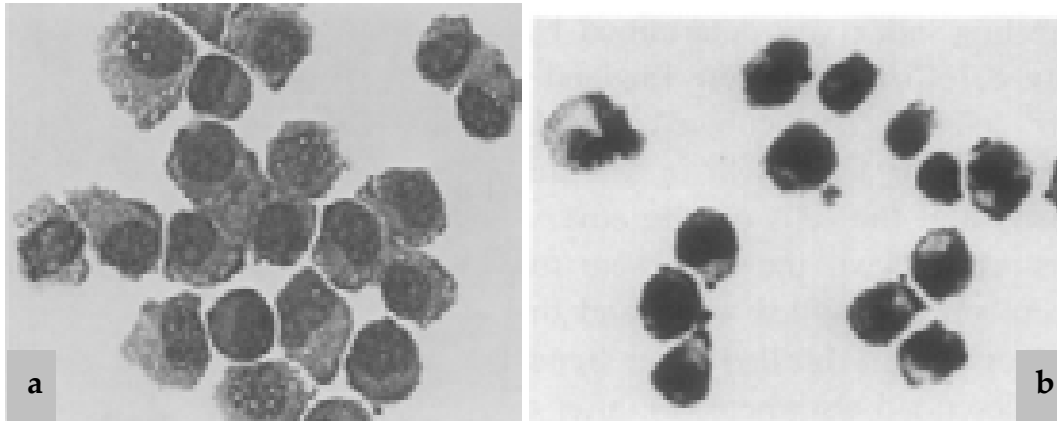


FIGURA 6.- Fotografías de líneas celulares (a) P388, (b) J774. Tomadas y modificadas de (Koren *et al.*, 1975; Van Furth *et al.*, 1985).

Ambas líneas celulares son consideradas como modelo de estudio *in vitro* e *in vivo* de leucemias monocítica de ratón por su alta capacidad de formar tumores (Kasukabe *et al.*, 1987; 1987; Coleman *et al.*, 1999). Y siendo

Biomoléculas activadoras de la hematopoyesis

Los factores de crecimiento hematopoyético, miembros de la familia de las citocinas, regulan la hematopoyesis *in vivo* e *in vitro*, controlando la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Sin embargo existen biomoléculas de origen y naturaleza distintas a las citocinas que afectan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, tal es el caso de la vitamina E, la vitamina A y el ácido retinoico (ATRA). El ATRA ha tenido un impacto en la terapia de problemas hemato-oncológicos, concretamente es la primera elección para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda (Fenaux, *et al.*, 2001). Lamentablemente el tratamiento de otro tipo de leucemia mieloide tiene un éxito reducido a pesar del uso de diferentes estrategias terapéuticas (List *et al.*, 2001): trasplante de médula ósea, inmunoterapia, bloqueadores de

blancos moleculares, o altas dosis de quimioterapia con el uso de citarabina (ARA-C, citocina arabinosido) que es usada principalmente en el tratamiento de leucemia mieloide aguda (Wiley *et al.*, 1982). La citarabina interviene en la fase S del ciclo celular, impidiendo la síntesis de DNA (Harrington & Perrino, 1995) y que constituyen un alto riesgo de daño a las células normales (Tallman, *et al.*, 2005), por lo que sigue vigente la necesidad de estudiar a profundidad, cada una de las alternativas de modulación hematopoyética para facilitar una visión más integral de la biología básica de la hematopoyesis y detectar nuevas estrategias terapéuticas para solucionar problemas hemato-oncológicos.

Caseínas

La leche y los productos lácteos son importantes en la dieta humana, a nivel mundial, contribuyen con cerca del 4% de la energía total. La leche de vaca es la más frecuentemente consumida (Kon, 1977) y está constituida por el 3.6% de proteínas, 4.1% de grasas, 5.0% de carbohidratos, menos del 1% de vitaminas y minerales y 86.6% de agua. La fracción proteica se encuentra compuesta por α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y caseína, esta última es la principal componente con el 80% de la fracción (Meisel, 1997). La caseína se encuentra constituida por partículas esféricas de dimensión no uniforme conocidas como micelas. Las micelas están conformadas por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas α -s1, α -s2, β y κ -caseína (Walstra y Jenneis, 1984).

La caseína es insoluble en agua, sin embargo, al ser diluida en un álcali a pH 6.6 origina preparados solubles llamados caseinatos. El caseinato de sodio (CasNa) es producto de la disolución de la caseína en una solución de hidróxido de sodio, seguido de la evaporación hasta que la humedad se reduce a un 4%; tras lo cual se obtiene un polvo blanco o incoloro, soluble en agua, sin sabor y con un 65% de

proteínas. Tanto el caseinato de sodio (CasNa) como la caseína, debido a su alto valor nutricional se han empleado en la industria alimenticia como fuente de proteínas en cereales, productos dietéticos y en aquellos destinados para pacientes con diabetes (Walstra y Jenneis, 1984)

Hace algunas décadas se realizaron estudios donde surgieron las primeras evidencias de la participación de la caseína en la hematopoyesis, particularmente porque una dieta desprovista de caseína provoca mielosupresión, mientras que la reincorporación de esta a la dieta la restablece (Aschkenasy, 1971). En años posteriores se reveló que una dieta a partir de caseína induce la producción de eritropoyetina y con ello activa la eritropoyesis (Okano *et al.*, 1992). Otros datos indican que puede activar a los leucocitos ya que la sal de caseína, el caseinato de sodio, inyectada vía intraperitoneal en ratones o peces, inducen una respuesta inflamatoria, promoviendo inicialmente la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal (Pasotti *et al.*, 1993, Metcalf *et al.*, 1996).

También 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 & Sachs, 1985). Además en investigación biomédica se ha observado que una dieta baja en caseínas incrementa la posibilidad de presentar tumores en colon de ratas (Tatsura *et al.*, 1992) mientras que una dieta rica en caseínas protege contra el desarrollo del cáncer intestinal en ratas (Mc Intosh *et al.*, 1995).

Desde hace algún tiempo, nuestro grupo de investigación ha mostrado que el caseinato de sodio (CasNa) tiene interesantes efectos biológicos sobre células hematopoyéticas, por ejemplo acelera la diferenciación de granulocitos-neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares (Santiago *et al.*, 2008), el CasNa y la alfa, beta y kappa caseína reducen la proliferación e induce diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago así como la expresión del gen del M-CSF y su receptor (M-CSFR) en las células 32D, mientras que bloquea la proliferación celular, sin inducir diferenciación o expresión de M-CSF o su receptor en la línea leucémica mielomonocítica WEHI-3 de ratón, (Ramos *et al.*, 2000; Ramos, 2004; Ramos *et al.*, 2008). Por otro lado, la adición de CasNa a células de médula ósea *in vitro*, a diferencia del efecto en las líneas celulares, activa la hematopoyesis normal además de diferenciarlas hacia macrófagos (Silvestre *et al.*, 2007). La activación de la hematopoyesis normal también se induce *in vivo* ya que la inyección de CasNa promueve la proliferación y diferenciación de granulocitos, macrófagos, linfocitos T y B (Silvestre, 2007; Domínguez, 2007), todas células de fundamental importancia en la respuesta inmune. Así nuestros datos indican que las caseínas pueden tener gran relevancia no sólo en la modulación de la hematopoyesis normal y leucémica, sino que también en la modulación de la respuesta inmune.

Por otro lado el hidrolizado de caseína obtenido de la digestión en el tracto digestivo o de digestión enzimática *in vitro*, presenta las mismas propiedades que la molécula completa (Gill *et al.*, 2000). En este contexto se ha reportado que el hidrolizado enzimático de caseína inyectado en ubre de vaca tiene la capacidad de inducir la acumulación de granulocitos en el sitio de inyección (Shamay *et al.*, 2003), además de que los péptidos de caseína liberados en tracto digestivo activan la respuesta inmune (Lahov & Regelson, 1996; Chabance *et al.*, 1998).

Este conjunto de datos nos indica que las caseínas y el hidrolizado de caseína no sólo son fuentes de nutrientes sino que además tienen capacidades como inmunomoduladores, además el CasNa parece activar la hematopoyesis normal, pero inhibir la proliferación de la línea mieloide normal 32D y de la leucémica mielomonocítica WEHI-3 de ratón, pero se desconoce si también inhibe la proliferación de otras líneas leucémicas, particularmente del linaje monocito-macrófago. De confirmarse que el CasNa bloquea la proliferación de líneas celulares leucémicas pero induzca la proliferación de células normales es de gran relevancia biomédica ya que una molécula con esta actividad, constituye la estrategia mas deseada para el tratamiento de problemas hemato-oncológicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha mostrado que el CasNa inhibe la proliferación e induce a la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de la línea celular mielóide 32D, así como también se ha mostrado que inhibe la proliferación de la línea leucémica mielomonocítica de ratón WEHI-3, pero se desconoce si el CasNa tiene la misma capacidad moduladora de la proliferación y diferenciación de otro tipo de leucemias mieloides, particularmente del linaje monocito-macrófago.. Por lo que el presente estudio, pretende contestar esta interrogante, usando como modelo de estudio a las líneas leucémicas monocíticas de ratón J774 y P388.

HIPÓTESIS

El caseinato de sodio (CasNa) inhiben la proliferación de la línea hematopoyética multipotencial 32D y de la línea leucémica mielomonocítica WEHI-3, ambas de ratón. Por lo que se espera que el CasNa tenga el mismo efecto inhibitorio en las líneas leucémicas monocíticas J774 y P388 de ratón.

OBJETIVOS

General:

Evaluar la participación del caseinato de sodio (CasNa) en la proliferación y diferenciación de las líneas leucémicas monocíticas de ratón J774 y P388.

Particulares:

1. Evaluar el efecto del CasNa en la proliferación de las células J774 y P388.
2. Evaluar el efecto del CasNa en la viabilidad de las células J774 y P388.
3. Evaluar el efecto citotóxico del CasNa en las células J774 y P388.
4. Evaluar el efecto del CasNa en la inducción de la diferenciación de las células J774 y P388.
5. Evaluar si el CasNa afecta la activación de las células J774 y P388.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

En este trabajo se emplearon las líneas leucemias monocíticas de ratón J774 y P388, las cuales fueron adquiridas de la American Type Collection Culture (ATCC); cultivándose en medio Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM) (Gibco BRL NY, USA) (apéndice A), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) previamente inactivado a 56°C (Gibco BRL, USA) (apéndice A), a una temperatura de 37°C, en una atmósfera al 5% de CO₂ (Freshney, 1994). Cada resiembra se realizaron con 2.5×10^4 células/mL de J774 y 1×10^5 células/mL de P388, en cajas Petri (Pyrex, Corning, Mex) cada 48 horas.

Cultivos bajo tratamiento con CasNa

Para evaluar el efecto del caseinato de sodio (CasNa) (USB, Cleveland, USA), primero se solubilizó el CasNa en agua destilada, al 10% (p/v), posteriormente se esterilizó por medio de autoclave. Los cultivos celulares se realizaron en placas de 96 pozos fondo plano (Corning NY, USA), con una densidad inicial de 1.2×10^4 células/mL y 3×10^4 células/mL, para J774 y P388 respectivamente, todo bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, posteriormente se adicionaron diferentes concentraciones de CasNa partiendo desde los 0.5, 1, 2 y 4 mg/mL y se incubaron por 72 horas, además se incluyeron cultivos con 8 microlitros (µL) de agua-inyectable estéril (como vehículo del experimento y control negativo), con tres repeticiones por condición. Adicionalmente se utilizó hidrolizado de caseína y albúmina (Sigma-Adrilch, USA) como controles de proteínas irrelevantes, bajo las mismas dosis y condiciones antes mencionadas.

Como control positivo se utilizó citarabina (Ara-C) en la dosis de 5 μ M. Una vez transcurrido el tiempo se evaluó la proliferación celular, viabilidad o citotoxicidad.

Evaluación de la proliferación celular con la técnica de cristal violeta.

Después de 72 h de cultivo se evaluó la proliferación por medio de la técnica de cristal violeta (Kueng et al., 1989). Brevemente, las células fueron fijadas con 50 μ l/pozo de glutaraldehído al 1.1 % (v/v) (apéndice B) durante 45 min, posteriormente se desechó y se dejó secar durante 5 min, y se adicionaron 50 μ l/pozo de cristal violeta (apéndice B) para teñir el DNA del núcleo de las células (Wakelin et al., 1981); lo cual, es un parámetro indirecto para cuantificar número celular (Gillies et al., 1986). Después, se agitó la placa por 10 min en un agitador de placas (Labnet International Inc. Woodbrigr, NY., USA), al término el colorante no asimilado por las células fue removido por lavados con agua destilada. Finalmente el colorante incorporado en las células se solubilizó 50 μ l/pozo de ácido acético al 10% (v/v) (apéndice B) y se agitó la placa durante 20 min Las placas fueron leídas a una densidad óptica de 570 nm en un lector de placas (Image, TECAN-SPECTRA, Germany) y se graficaron como porcentaje de proliferación celular con respecto al control negativo.

Evaluación de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó empleando la técnica de reducción de una sal de tetrazolio, en este caso 3-(4.5-dimetiltiazol-2-y-1)-5-(3-carbimetoxifenil)-2-(sulfofenil)-2H- tetrazolio (MTS) (Denizot & Lang, 1986), mediante la actividad de de la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas

(Borenfreud *et al.*, 1988), mediante la aceptación de H^+ , en donde la sal de tetrazolio forma cristales azules de formazan insolubles en agua, pero soluble sólo en disolventes orgánicos como el etanol, isopropanol, dimetil sulfóxido (Tominaga *et al.*, 1999). La cantidad de formazan producido es directamente proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazan en solución (Castro, 2006). El método ha sido usado exitosamente para monitorear la sensibilidad de células de tumores humanos a agentes quimioterapéuticos (Ferrari *et al.*, 1990). Para determinar la viabilidad se utilizó un Kit de MTS nombrado CellTiter 96[®] AQUEOUS Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA). Brevemente, después de 72 h de cultivo se adicionan 20 μ l del kit Cell Titer por cada 100 μ l de medio contenido en el pozo, posteriormente se incubaba por 4 horas a 37° C una atmósfera al 5% de CO_2 , para ser leído a una densidad óptica de 490 nm en un lector de placas (Image, TECAN-SPECTRA, Germany), los datos obtenidos son graficados.

Evaluación del efecto citotóxico

La citotoxicidad se evaluó mediante la técnica de liberación de lactato de deshidrogenasa (LDH), una enzima que se encuentra en el citoplasma celular y es importante en la reducción de glucólisis, que se lleva a cabo en el citosol al interior de la célula viva (Tejió *et al.*, 2006). LDH es empleada para cuantificar el daño a la membrana celular mediante la liberación del lactato de deshidrogenasa en el sobrenadante (Fischer *et al.*, 2002). La actividad de LDH este es medido por una prueba enzimática la cual primero el NAD^+ es reducido a $NADH/H^+$ por tanto el LDH catalizado es convertido a lactato de piruvato. En la segunda etapa de catálisis se transfieren H/H^+ y se convierte en sal de tetrazolio el cual es reducido a formazan y por tanto puede ser identificado colorimétricamente (Abe & Matsuki *et al.*, 2000). Para determinar el porcentaje

de citotoxicidad se requiere de un control positivo el cual permitió obtener la toxicidad celular absoluta, media hora antes de concluir el tiempo de cultivo se adicionó una solución de tritón X-100 al 2% con medio de cultivo, en relación 1:1; transcurrido el tiempo de cultivo se evaluó la citotoxicidad con el Kit Cytotoxicity Detection (LDH) (Roche, Diagnostics, Germany). Brevemente, primero la placa es centrifugada 5min a 2000 rpm, en una centrifuga (HERMLE Z320, Germany), posteriormente es retirado de cada pozo 100 µl de medio libre de células y adicionados en otra placa de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA., USA), seguido de adicionar 100 µl por pozo de solución para detectar LDH y es incubado por 30 min protegido de la luz a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo de incubación es leído a una densidad óptica de 490 nm en un lector de placas (Image, TECAN-SPECTRA, Germany).

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad para cada una de las concentraciones de los tratamientos (CasNa, hidrolizado de caseína y albúmina). Se calculan los valores de absorbancia promedio para cada una de las condiciones, de tal modo que; los valores resultantes fueron sustituidos en la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{(\text{Valor experimental} - \text{Valor del control negativo})}{(\text{Valor del control positivo} - \text{Valor del control negativo})} \times 100$$

(Tritón)

Evaluación de Diferenciación Celular

Para la evaluación de diferenciación, las células fueron cultivadas en un portaobjetos con cámara de cultivo (Chamber Slide, Lab-tek, NUNC, USA) bajo las condiciones de cultivo de tratamiento antes mencionadas utilizando las concentración de 2mg/mL para CasNa, hidrolizado de caseína y albúmina, las después de 72 h de cultivo las células fueron teñidas con Wright (Hycel, México). Brevemente a los portaobjetos con células se adicionan 1 mL de colorante Wright y después de 3 min se adicionan 1 mL de Buffer de fosfatos pH 6.4 (Hycel, México) y se dejan durante 7 min más, al término de este tiempo son enjuagadas con agua destilada, posteriormente se dejaron secar y se determino la morfología con la ayuda del microscopio (Carl Zeiss, Germany), diferenciando los blastos del linaje monocito-macrófago, así como la forma del núcleo y la proporción núcleo-citoplasma (Mc Donal, 1995)(apéndice C).

Actividad Funcional

La actividad funcional de las células J774 y P388 tratadas y no, fue evaluada mediante la técnica de reducción de NBT (Nitro blue tetrazolium). Cuando se lleva acabo la fagocitosis hay liberación de radicales libres de oxígeno como el anión superoxido (O_2^-), los cuales en condiciones normales pueden ser reducidos a H_2O_2 , mediante la enzima NADPH-oxidasa. En este sentido la reducción de NBT ocurre cuando, compitiendo con el oxígeno, la molécula es reducida por el sistema NADPH-oxidasa hasta su estado de formazan, un producto insoluble de color azul que puede leído con un espectrofotómetro. La reducción de NBT también ocurre por efecto directo del O_2^- (Baehner *et al.*, 1976; Godfrey & Wilder,

1984; Rojas & Paredes, 2004). Para poder realizar la evaluación mediante la técnica de reducción de NBT, primeramente las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos (Corning NY, USA), a una densidad inicial de 1.5 y 2×10^4 , células/ mL, para J774 y P388 respectivamente, todo bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, utilizando las concentraciones de 2mg/mL para CasNa, hidrolizado de caseína y albúmina. Después de las 72 h de cultivo, las células fueron despegadas con verseno y lavadas con PBS (Phosphate buffer solution) (apéndice A) y son colocadas a una densidad de 2×10^6 células/mL en tubos siliconizados con los siguientes reactivos, mantenidos en baño maría a 37°C:

<i>Reactivos:</i>	<i>Células en reposo</i> (μ l)	<i>Células fagocitando</i> (μ l)
Krebs-Hensert	400	350
Zymosan opsonizado	-----	50
KCN	100	100
NBT	400	400
Suspensión celular	100	100

Una vez contenidos todos los reactivos en los tubos, estos se incuban 15 min a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación se adiciona 1 mL/tubo de HCl al 2.5 N para detener la reacción de fagocitosis, posteriormente se centrifugan 15 min a 2000 rpm, (centrifuga Beckman TJ-6,CA, USA), después es desechado el sobrenadante y se adicionan 2 mL de piruvato (Sigma-Adrilch, USA). Finalmente cada tubo es leído en un espectrofotómetro a 515 nm. (Perkin Elmer MBA 2000, USA), contando como blanco únicamente piruvato. Los datos obtenidos son graficados.

Manejo de Datos y Análisis Estadístico

Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces de manera independiente, con cuatro repeticiones cada uno. Los datos obtenidos se procesaron por un Análisis de Varianza (ANOVA), después las medias se compararon para obtener la diferencia significativa mediante la prueba de Tukey y la prueba de Dunnett, ($p < 0.05$), se realizaron empleando el programa SPSS (versión 11.0) estándar para Windows (2001).

RESULTADOS

OBJETIVO 1:

Evaluación del efecto del CasNa en la proliferación de las células J774 y P388

Para estudiar el efecto del CasNa, hidrolizado de caseína (HC) y albúmina (Alb) en la proliferación de las líneas celulares mieloide J774 y P388, se realizaron ensayos con o sin 0.5, 1, 2 y 4 mg/mL de CasNa, HC y Alb, después de 72 horas de cultivo se observó bajo el microscopio y se evaluó la proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta.

Al observar las placas de cultivo bajo el microscopio, en ambas líneas y en forma dosis dependiente, se detectó menor densidad celular en los pozos de cultivo tratados con CasNa e HC. También se observan cambios morfológicos como pérdida de adherencia y aumento del tamaño. Los cultivos tratados con albúmina, aún con la dosis más alta no modificó la densidad celular en relación al control (Figuras 7 y 8).

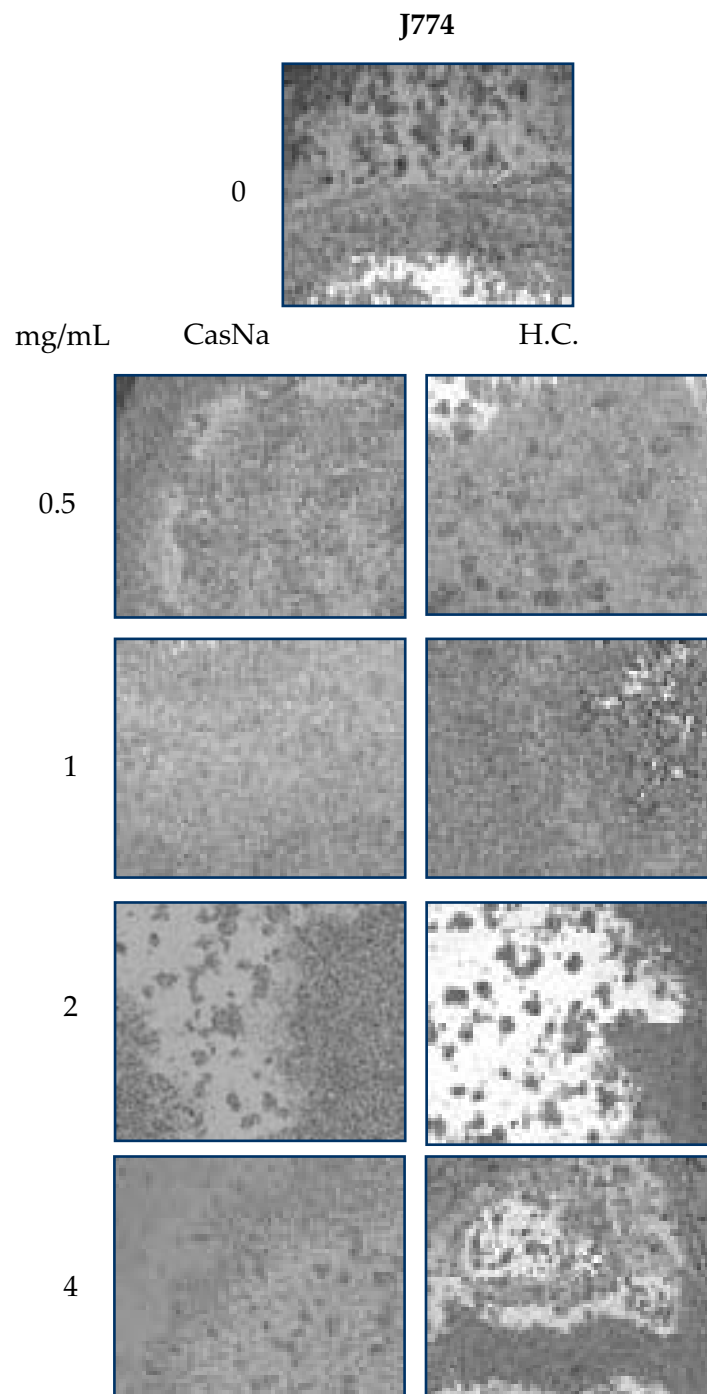


FIGURA 7.- Fotografías a las 72 h de cultivo de la línea celular J774 a 50X, que muestran reducción de la densidad celular en forma dosis-respuesta al tratamiento con caseinato de sodio (CasNa) e hidrolizado de caseína (HC). Control con vehículo (0), CasNa e HC [0.5, 1, 2, y 4 mg/mL].

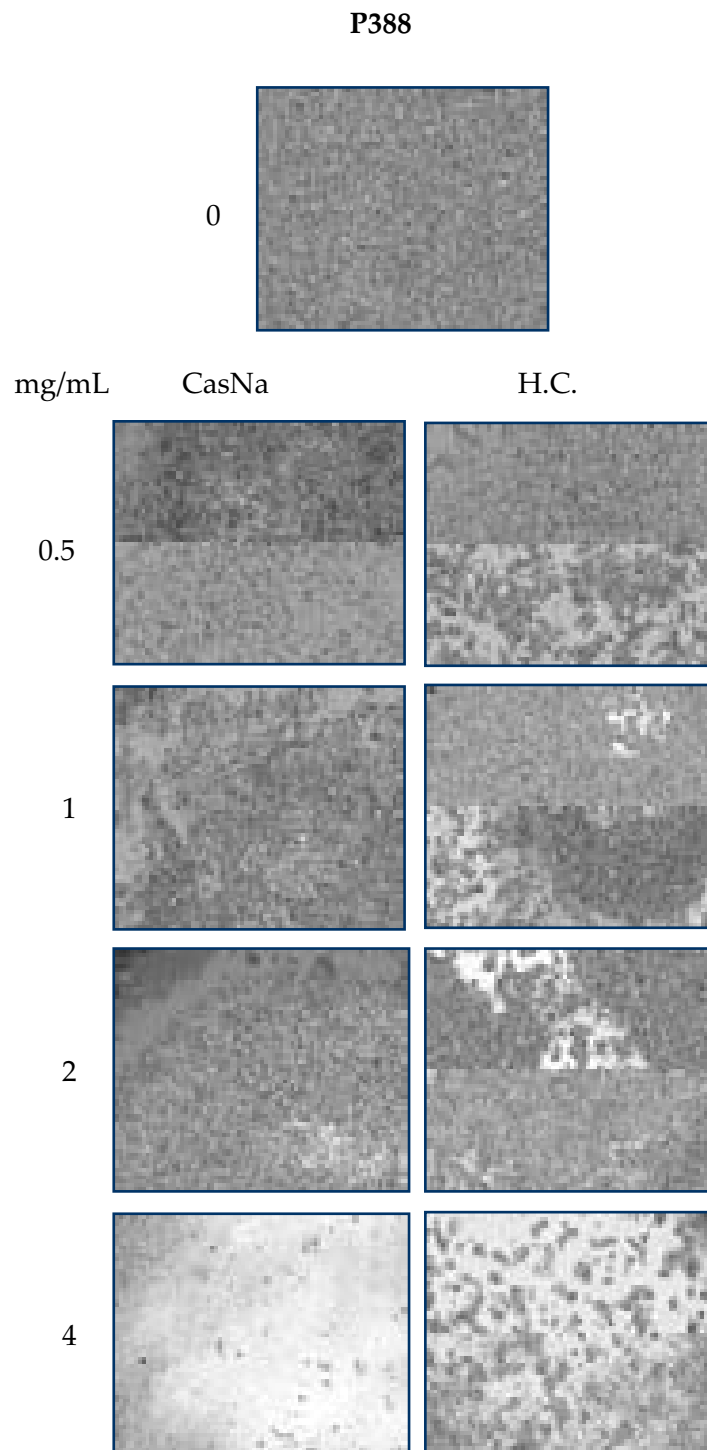


FIGURA 8.- Fotografías a las 72 h de cultivo de la línea celular P388 a 50X, que muestran reducción de la densidad celular en forma dosis-respuesta al tratamiento con caseinato de sodio (CasNa) e hidrolizado de caseína (HC). Control con vehículo (0), CasNa e HC [0.5, 1, 2, y 4 mg/mL].

Al observar reducción en la densidad celular en los cultivos tratados con CasNa e HC, procedimos a realizar un análisis cuantitativo de la proliferación, mediante la técnica de cristal violeta. Los datos obtenidos muestran que para el caso de las células J774, el CasNa induce una disminución significativa ($p < 0.05$) de la proliferación desde la dosis de 1 mg/mL y a medida que se aumenta existe mayor reducción alcanzando una inhibición de casi 90 % para la concentración de 4 mg/mL, mientras que el HC sólo muestra una diferencia significativa desde 2 mg/mL y alcanza una reducción del 40% para la dosis de 4 mg/mL; finalmente la albúmina no afecta la proliferación de esta línea celular (Figura 9).

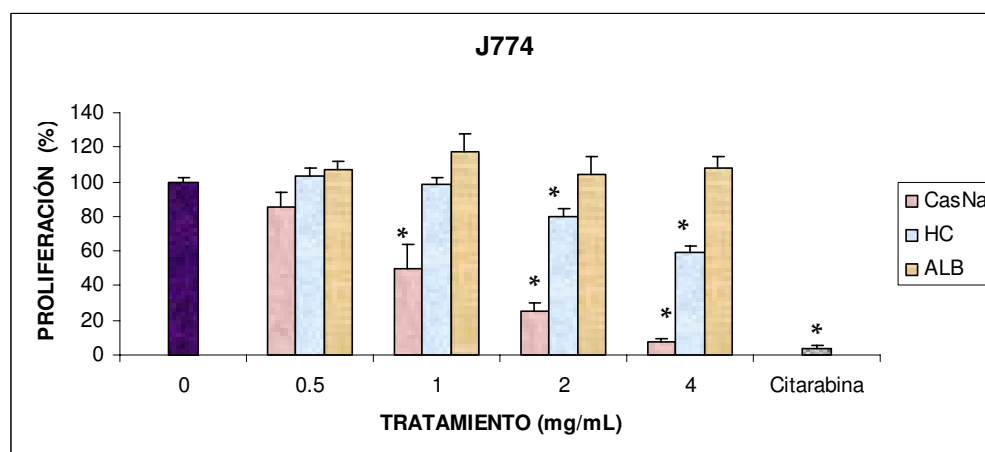


FIGURA 9.- Reducción de la proliferación de la línea celular J774 en forma dosis-respuesta inducida por el caseinato de sodio (CasNa), hidrolizado de caseína (HC) y albúmina (Alb), evaluada por cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo [0], CasNa, HC y Alb [0.5, 1, 2, y 4 mg/mL]. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo.

Para la línea celular P388, los datos obtenidos muestran que el CasNa tiene una reducción significativa ($p < 0.05$) a partir de 1 mg/mL inhibiéndose en forma dosis dependiente hasta 4 mg/mL, mientras que para HC los datos muestran que sólo a partir de 2 mg/mL hay una reducción significativa ($p < 0.05$) y con 4 mg/mL sólo alcanza una reducción del 30% con respecto al control; la albúmina no afecta la proliferación celular (Figura 10). Estos datos obtenidos corroboran lo observado al microscopio.

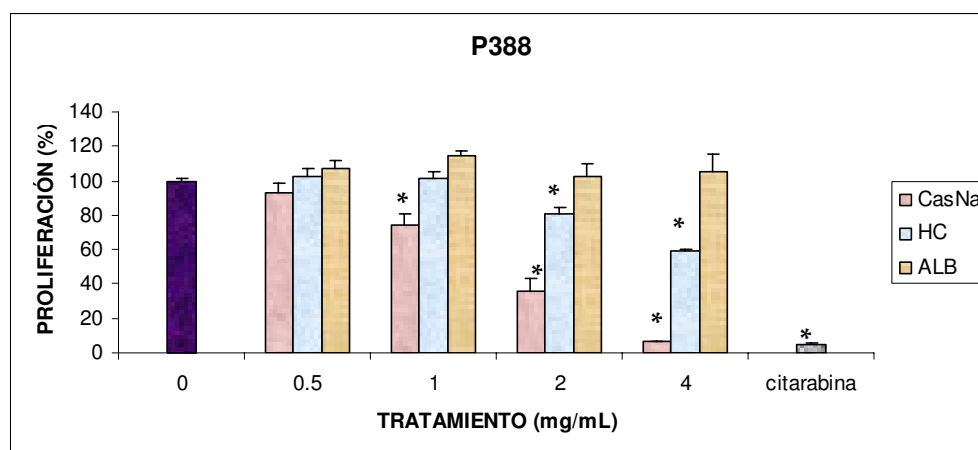


FIGURA 10.- Reducción de la proliferación de la línea celular P388 en forma dosis-respuesta inducida por el caseinato de sodio (CasNa), hidrolizado de caseína (HC) y albúmina (Alb), evaluada por cristal violeta después de 72 h de cultivo. Control con vehículo [0], CasNa, HC y Alb [0.5, 1, 2, y 4 mg/mL].

* Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo.

OBJETIVO 2.

Evaluación de la viabilidad de las células J774 y P388 tratadas con CasNa

Al encontrar que las células tratadas con diferentes dosis de CasNa e HC inhibe su proliferación; se propuso analizar el efecto que tienen las diferentes dosis sobre la viabilidad celular. Para ello se realizaron ensayos con o sin 0.5, 1, 2 y 4 mg/mL de CasNa, HC y Alb, utilizando como control positivo de inhibición a la citarabina (Ara-C) en las dosis 5 μ M, después de 72 horas de cultivo, se evaluó la viabilidad con el kit de MTS, CellTiter 96[®] Aqueous Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA).

Los datos obtenidos muestran que para la línea J774, tanto el CasNa, HC y albúmina afectan significativamente ($p < 0.05$) la viabilidad desde la dosis de 0.5 mg/mL, en comparación con la citarabina que afecta la viabilidad hasta un 50% (Figura 11).

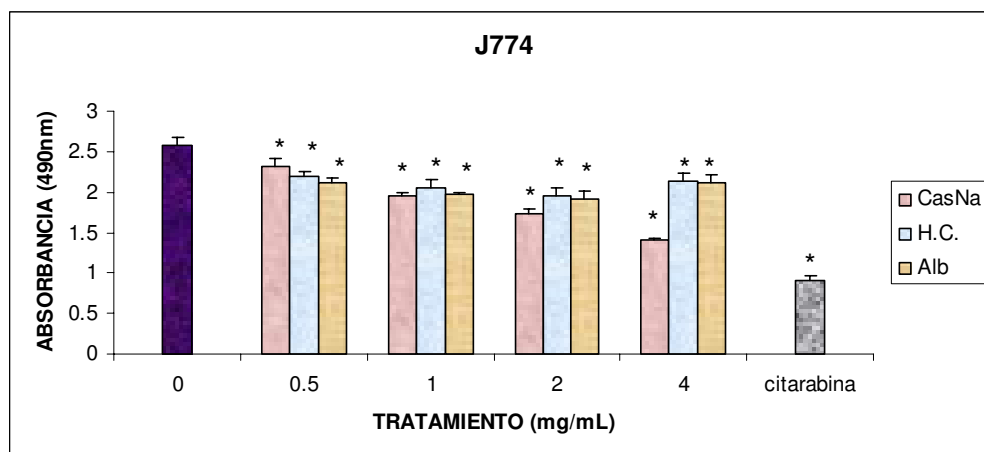


FIGURA 11.- Viabilidad de las células J774 con diferentes dosis (0.5, 1, 2, y 4 mg/mL) de caseinato de sodio (CasNa), hidrolizado de caseína (HC) o albúmina (Alb), evaluada por la técnica de MTS después de 72 h de cultivo. Control con vehículo [0], CasNa, HC y Alb. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo

Sin embargo, para la línea celular P388, se observó que el CasNa e HC afectan la viabilidad significativamente ($p < 0.05$) desde la dosis de 1 mg/ml, mientras que albúmina solo afecta significativamente ($p < 0.05$) la viabilidad hasta la dosis de 4 mg/mL. Pero en ninguno de los tratamientos afecta tan fuertemente la viabilidad como en el caso de la citarabina la cual la reduce hasta en un 50% (Figura 12).

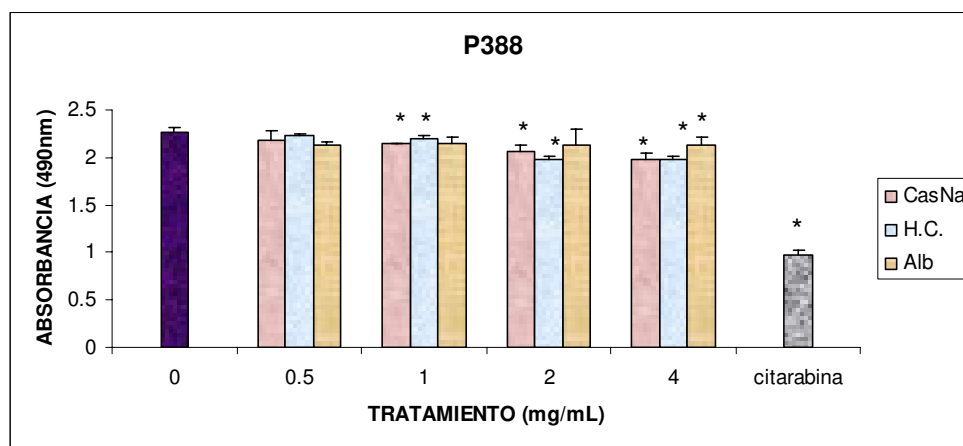


FIGURA 12.- Viabilidad de las células P388 con diferentes dosis (0.5, 1, 2, y 4 mg/mL) de caseinato de sodio (CasNa), hidrolizado de caseína (HC) o albúmina (Alb), evaluada por la técnica de MTS después de 72 h de cultivo. Control con vehículo [0], CasNa, HC y Alb [0.5, 1, 2, y 4 mg/mL]. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo.

OBJETIVO 3:

Evaluar la citotoxicidad de las células J774 y P388 tratadas con CasNa

Debido a que el CasNa e hidrolizado de caseína, aunque escasamente pero reducen en forma estadísticamente significativa la viabilidad de las líneas celulares J774 y P388, consideramos pertinente confirmar el daño citotóxico, por lo tanto las células fueron tratadas a diferentes concentraciones con y sin 0.5, 1, 2 y 4 mg/mL, de caseinato de sodio (CasNa), hidrolizado de caseína (HC) y albúmina (Alb); adicionalmente se incluyeron cultivos como controles positivos para la toxicidad celular con 100 μ L de una solución de Triton X-100 y citarabina (ARA-C, citosina arabinosido) en las dosis 5 μ M; después de 72 horas de cultivo el ensayo fue evaluado mediante el kit LDH citotoxicity (Roche, USA).

Los datos obtenidos indican que a medida que se aumenta la concentración de CasNa e hidrolizado, aumenta significativamente ($p < 0.05$) el efecto citotóxico sobre la línea celular J774, alcanzando un nivel similar al de la citarabina de más del 100% para las dosis de 4 mg/mL. Mientras que en albúmina también se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al control cerca del 40% desde la dosis de 0.5 mg/mL, pero mantiene este comportamiento aún en la dosis de 4mg/mL (Figura 13).

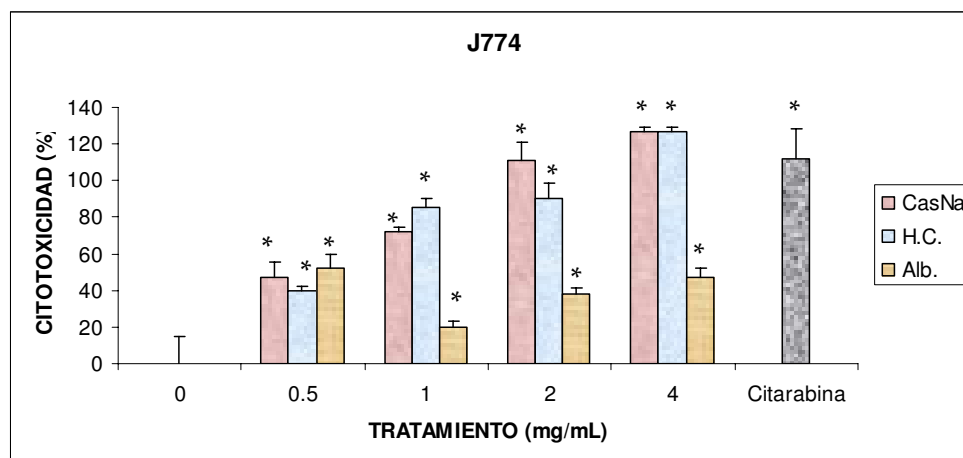


FIGURA 13.- Efecto citotóxico dosis-respuesta del caseinato de sodio (CasNa), hidrolizado de caseína (HC) y albúmina (Alb) sobre la línea celular J774, evaluada por la técnica de LDH al medio de cultivo después de 72 h de cultivo. Control con vehículo [0], CasNa, HC y Alb [0.5, 1, 2, y 4 mg/mL]. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo.

Para la línea celular P388, los datos revelan que el CasNa desde la dosis de 0.5 mg/mL tiene un efecto citotóxico significativo ($p < 0.05$) y a medida que aumenta la dosis se ve aumentada la liberación de LDH, alcanzando los mismos porcentajes de citotoxicidad inducida por la citarabina. El hidrolizado de caseína tiene un efecto significativo ($p < 0.05$) de toxicidad a partir de 2 mg/mL y alcanza una liberación de LDH cerca del 25% para la dosis de 4 mg/mL; mientras que la albúmina solo muestra efecto citotóxico significativo ($p < 0.05$) hasta 4mg/mL cercano al 15% (Figura 14).

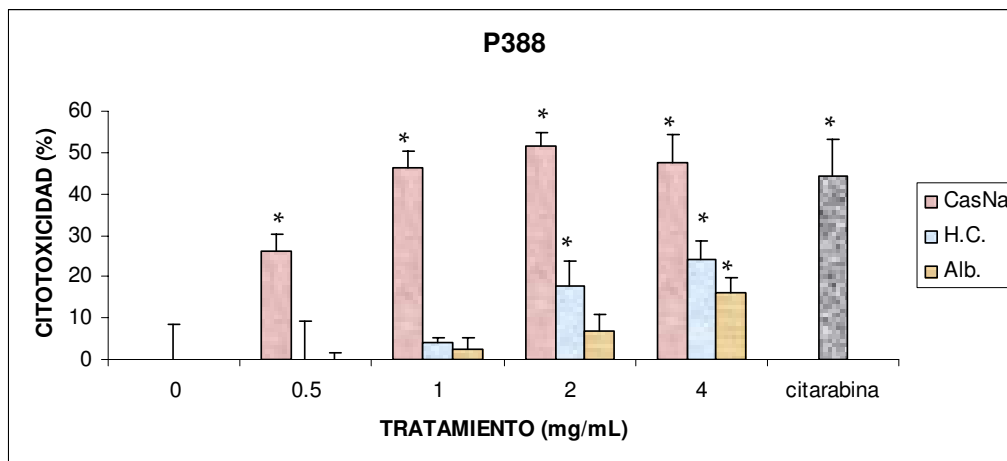


FIGURA 14.- Efecto citotóxico dosis-respuesta del caseinato de sodio (CasNa), hidrolizado de caseína (HC) y albúmina (Alb) sobre la línea celular P388, evaluada por la técnica de LDH al medio de cultivo después de 72 h de cultivo. Control con vehículo [0], CasNa, HC y Alb [0.5, 1, 2, y 4 mg/mL]. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo.

OBJETIVO 4.

Evaluación del CasNa sobre la diferenciación de las células J774 y P388

Una célula bajo los estímulos de ciertos factores pueden diferenciarse (Sachs, 1996). El bajo índice de proliferación puede ser resultado de una diferenciación de las células hacia uno o varios linajes (Lee *et al*, 1998), por lo anterior, se evaluó la morfología en las células después de teñirlas con colorante Wright (Hycel, México), tratadas con 2 mg/mL de CasNa, hidrolizado de caseína y albúmina, concentración que afectó tanto la proliferación, viabilidad así como liberación de LDH en las células J774 y P388. La morfología de las células teñidas con colorante Wright (Hycel, México) se determino comparando los tratamientos con respecto al control, obteniendo los porcentajes de diferenciación de las células. El criterio de evaluación fue el tamaño y la forma del núcleo, tomado en cuenta la relación núcleo citoplasma y características del citoplasma.

Los resultados muestran que los cultivos control de las células J774 presentan un porcentaje del 94% de monoblastos y al ser tratadas con CasNa e HC, inducen su diferenciación hacia el linaje promonocito (27%), y en un 57 y 70 %, respectivamente hacia el linaje monocito-macrófago. Finalmente la albúmina en esta línea celular muestra que después del tratamiento solo llegan al linaje promonocítico un 51 % el resto se mantienen como monoblastos (Figura 15 y Tabla 2).

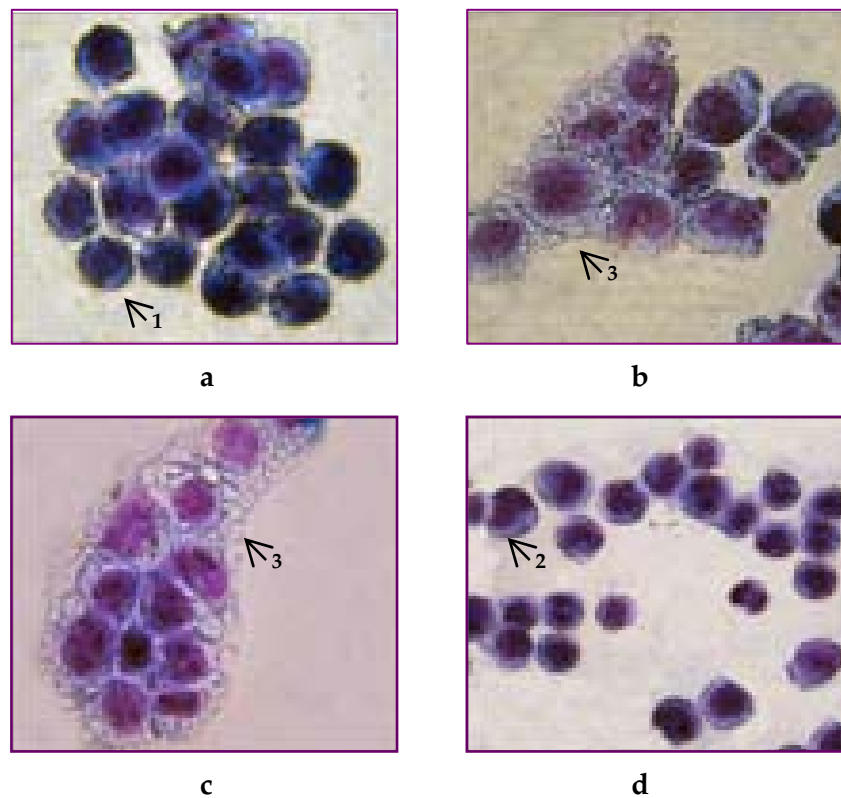


FIGURA 15.- Morfología de las células J774 (400X) en presencia de 2 mg/mL de CasNa, hidrolizado de caseína y albúmina. Las células fueron cultivadas por 72 horas y teñidas con Wright. a) control con vehículo, b) caseinato de sodio, c) hidrolizado de caseína y d) Albúmina.(1: monoblasto, 2: promonocito, 3: monocito-macrófago).

	0 %	CasNa %	HC %	Alb %
Monoblastos	94 ± 4	17 ± 4	4 ± 2	40 ± 8
Promonocitos	6 ± 4	26 ± 7	26 ± 2	51 ± 9
Monocito-macrófago	-----	57 ± 3	70 ± 4	1 ± 1

TABLA 2.- Diferenciación morfológica. Inducción a la diferenciación de las células J774 tratadas con 2 mg/mL de Caseinato de sodio (CasNa), Hidrolizado de caseína (HC) y albúmina (Alb), después de 72 h de cultivo fueron teñidas con Wright. Control con vehículo [0]. Porcentaje de monoblastos, promonocitos y monocito-macrófago.

Para el caso de las células P388 las evaluaciones muestran que la mayor parte de la población control se encuentra en promonocitos (54%) y monoblastos (24%), pero al ser tratadas con CasNa e HC estas presentan características del linaje monocito-macrófago en un 50 y 64 % respectivamente, mientras que con albúmina solo se ve un aumento en el linaje promonocito con respecto al control positivo (Figura 16 y Tabla 3). El hidrolizado de caseína, además lleva a las células a una morfología de tipo fibroblástica, una característica de macrófagos activados.

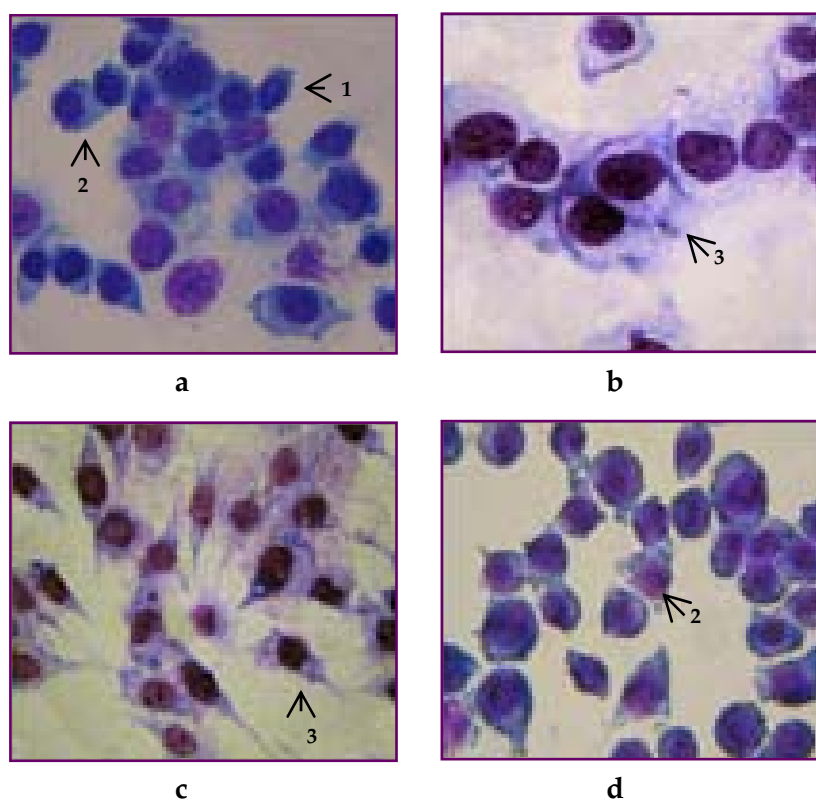


FIGURA 16.- Morfología de las células P388 (400X) en presencia de 2 mg/mL de CasNa, hidrolizado de caseína y albúmina. Las células fueron cultivadas por 72 horas y teñidas con Wright. a) control con vehículo, b) caseinato de sodio, c) hidrolizado de caseína y d) Albúmina. (1: monoblasto, 2: promonocito, 3: monocito-macrófago).

	0 %	CasNa %	HC %	Alb %
Monoblastos	24 ± 1	5 ± 1	8 ± 4	12 ± 8
Promonocitos	54 ± 5	45 ± 6	28 ± 8	71 ± 2
Monocito-macrófago	22 ± 5	50 ± 4	64 ± 4	17 ± 6

TABLA 3.- Diferenciación morfológica. Inducción a la diferenciación de las células P388 tratadas con 2 mg/mL de Caseinato de sodio (CasNa), Hidrolizado de caseína (HC) y albúmina (Alb), después de 72 h de cultivo fueron teñidas con Wright. Control con vehículo [0]. Porcentaje de monoblastos, promonocitos y monocito-macrófago.

OBJETIVO 5:

Evaluar si el CasNa afecta la activación de las células J774 y P388

Al encontrar que ambas líneas celulares tratadas con CasNa e hidrolizado de caseína, presenta diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago, nos preguntamos si también altera la activación celular, para ello y de acuerdo con la literatura donde se ha reportado que los fagocitos mononucleares tienen la capacidad de fagocitar tanto a bacterias como a levaduras, y que en este proceso se lleva a cabo la liberación de radicales libres de oxígeno y por tanto este evento puede ser cuantificado por medio de la técnica de reducción del azul de tetrazolio (NBT). Para ello las células J774 y P388 fueron tratadas con 2 mg/mL de CasNa, hidrolizado de caseína o albúmina y después de 72 horas de cultivo fue evaluada la capacidad fagocítica mediante la reducción de NBT.

Los datos obtenidos muestran que para ambas líneas celulares sólo el CasNa tiene un aumento significativo ($p < 0.05$), con respecto al control, en la reducción de NBT lo que nos indica que el CasNa no sólo está ayudando a diferenciar morfológicamente a las líneas celulares, sino que además está favoreciendo la activación (Figura 17 y 18).

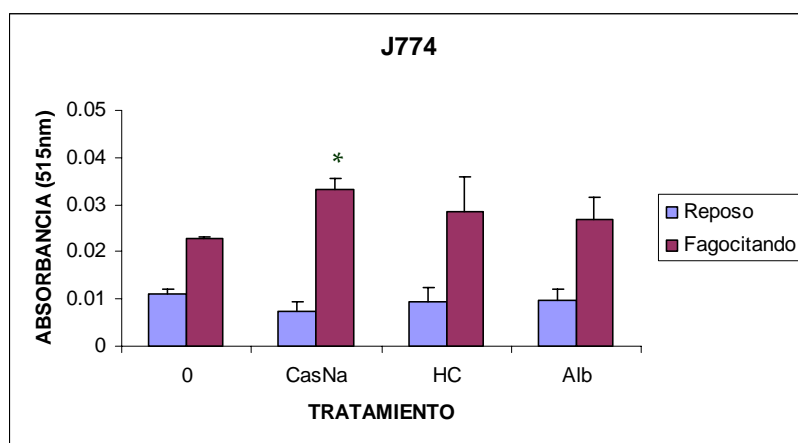


FIGURA 17. Actividad fagocítica de las células J774 en presencia de 2 mg/mL de CasNa, hidrolizado de caseína y albúmina. Las células fueron cultivadas por 72 horas y evaluadas mediante la técnica reducción de NBT. Control con vehículo [0]. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo.

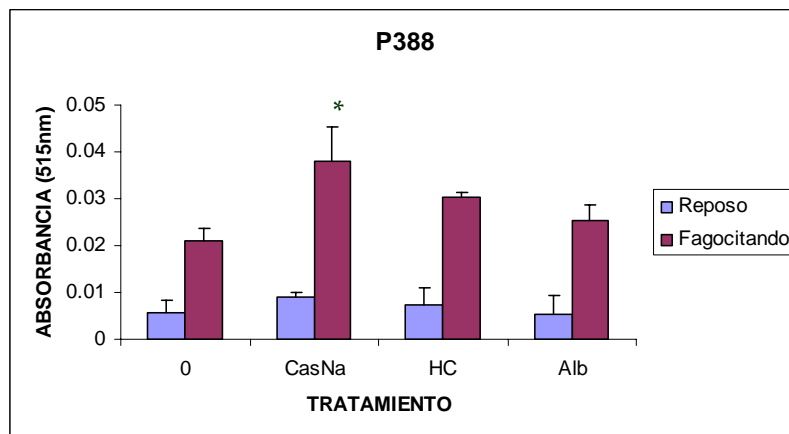


Figura 14. Actividad fagocítica de las células P388 en presencia de 2 mg/mL de CasNa, hidrolizado de caseína y albúmina. Las células fueron cultivadas por 72 horas y evaluadas mediante la técnica reducción de NBT. Control con vehículo [0]. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente la leche y los productos lácteos son alimentos básicos para la población en general (Walstra, 1984; Lönnnerdal, 2003), sin embargo, además de su reconocido papel nutricional, en las últimas décadas la atención ha sido puesta en las actividades biológicas de algunos de sus componentes, y particularmente la sal de caseína el caseinato de sodio (CasNa). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en la línea multipotencial normal de ratón 32D el CasNa inhibe la proliferación pero induce su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago y la expresión de M-CSF así como su receptor (M-CSFR), interesantemente también inhibe la proliferación de la línea leucémica mielomonocítica de ratón WEHI-3 (Ramos *et al.*, 2008) pero se desconoce si lo hace en otras líneas leucémicas y si es una propiedad exclusiva de esta molécula proteica.

En este trabajo, se muestra que el CasNa inhibe la proliferación de dos líneas leucémicas de linaje monocito-macrófago de ratón J774 y P388, parcialmente lo hace el hidrolizado de caseína pero no la albúmina. Estos datos indican que la actividad inhibitoria para estas células es propiedad del CasNa y no de cualquier proteína. El hecho de que el hidrolizado de caseína tenga un efecto inhibitorio no sorprende si consideramos que es producto de la degradación enzimática de la caseína (Gill *et al.*, 2000) y el CasNa es una sal de la caseína (Walstra, 1984). Debido a que empleamos las mismas dosis de HC y CasNa, pero CasNa es la única que presenta mayor efecto inhibitorio, sugiere que se requiere de moléculas completas para tener un efecto inhibitorio contundente, incluso ni siquiera la alfa, beta o kapa-caseína, subunidades que integran al CasNa, por si mismas no alcanzan el efecto inhibitorio que tienen el CasNa en la células 32D (Ramos *et al.*, 2008).

Aunque es evidente que se requiere la molécula completa del CasNa para inhibir fuertemente la proliferación de J774 y P388, es interesante que fragmentos de caseína hagan lo propio en estas líneas, dato que concuerda con reportes previos en el que se establece que algunos péptidos bioactivos de caseína como las casomorfina, glicomacropéptidos y fosfopéptidos, casoxinas casokininas, casoplatelinas, isracidina e inmunopéptidos, presentan diferentes actividades biológicas como inmunomoduladores, inhibidor de angiotensina, opioide, entre otros (Meisel y Bockelmann, 1999); pero ninguno ha sido reportado con actividad inhibidora de proliferación para células leucémicas. Estos péptidos, pueden ser liberados por proteólisis enzimática como por ejemplo durante la digestión gastrointestinal o en el caso de los productos fermentados por acción proteasa del cultivo responsable de la fermentación (Frankel *et al.*, 1992). Por lo anterior, sería interesante aislar y purificar al o los péptidos bioactivos contenidos en el hidrolizado de caseína responsable de la inhibición de la proliferación.

Al evaluar la viabilidad celular por ensayos de MTS, una técnica ampliamente empleada para evaluar este parámetro (Buttker *et al.*, 1993; Tominaga *et al.*, 1999; Abe & Matsuki, 2000), se encontró que la adición de hidrolizado de caseína, albúmina y CasNa, solo reducen ligera pero significativamente la viabilidad celular en ambas líneas celulares, sin embargo al evaluar la citotoxicidad mediante la liberación de LDH, se encuentra que el CasNa y el hidrolizado de caseína consistentemente y en forma dosis dependiente ejercen un efecto citotóxico.

Aunque estos datos parecen contradictorios, encontramos en la literatura que la reducción de MTS a formazan realizado en principio por la enzima succinato deshidrogenasa de la mitocondria activa, la reducción ocurre aún cuando la célula permite la entrada de bromuro de etidio, molécula que solo penetra a la células si la membrana plasmática ha sido dañada (Loveland *et al.*, 1992), lo cual indica que la reducción de MTS a formazan ocurre a pesar de que la membrana celular se encuentre dañada. De acuerdo a esta información, no es de extrañarse que aunque encontremos ligera reducción de la viabilidad reportado por el ensayo de MTS, tengamos altos niveles de liberación de LDH. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que bajo nuestras condiciones de trabajo, el ensayo de MTS es poco sensible para evaluar viabilidad, y que su uso debe acompañarse de una metodología que evalúe citotoxicidad.

Por otro lado, la reducción de proliferación se asocia con una inducción a la diferenciación celular (Lee *et al.*, 1998). Al evaluar el efecto del CasNa, HC y albúmina en ambas líneas celulares se encontró que solo el HC y CasNa inducen una fuerte diferenciación celular en J774 y P388, pero solo CasNa induce a la producción de radicales libres como un indicio de activación celular en ambas líneas. Estos datos se suman a la capacidad del CasNa y del HC para inducir diferenciación en las células 32D y WEHI-3 (Muñoz, 2005), lo cual indica que al igual que la propiedad de inhibir la proliferación, mantiene la capacidad para inducir su diferenciación en líneas leucémicas por lo menos del linaje monocito-macrófago. Este dato puede tener relevancia si consideramos que el ATRA inhibe la proliferación y al mismo tiempo induce la diferenciación de la leucemia promielocítica aguda, motivo por el cual hoy es la primera opción de tratamiento para pacientes con este tipo de leucemia (Fenaux, *et al.*, 2001). Sería interesante en un futuro evaluar si el CasNa conserva la propiedad e inhibir la proliferación e inducir la diferenciación de leucemias del linaje monocítico *in vivo*, lo cual lo ubicaría como una posible opción terapéutica para este tipo de leucemias.

Es interesante señalar que aún cuando el ATRA es la primera opción de tratamiento para pacientes con leucemia promielocítica aguda, desafortunadamente no todos los pacientes presentan remisión y en los casos de recaída la leucemia es letal (Cadena & Carpio, 2007; Warrell, 1993). Considerando que el CasNa también induce la diferenciación del linaje granulocítico (Santiago *et al.*, 2008), sería interesante evaluar si inhibe la proliferación e induce la diferenciación de leucemias promielocíticas, y de esta forma ampliar el conocimiento del potencial antileucémico no solo mieloide sino también linfoide.

Recientes estudios de nuestro grupo de trabajo se ha encontrado que el CasNa tiene efecto sobre la hematopoyesis normal *in vitro*. En cultivos de células de médula ósea (MO) en presencia de IL-3 y CasNa se ha observado aumento en la proliferación celular así como inducción de diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago (Silvestre *et al.*, 2007), un efecto contrario al observado en la línea leucémica J774 y P388 como se muestra en esta tesis. En otras palabras, en líneas leucémicas la proliferación se inhibe, mientras que en cultivos de MO esta aumenta; pero mantiene en ambos casos el potencial diferenciador, algo que hasta el momento no ha podido ser visto con las moléculas que se emplean para combatir el cáncer; todos afecta tanto en células normales como tumorales (Green, 2005). Así el CasNa elimina células leucémicas pero ayuda a las normales, una estrategia deseada para los tratamientos hemato-oncológicos. Por los que sugiere ampliar el conocimiento y conocer los mecanismos de acción que tiene el CasNa tanto en células normales como leucémicas.

CONCLUSIONES

- El caseinato de sodio (CasNa) inhibe la proliferación en forma dosis dependiente a las líneas leucémicas monocíticas de ratón J77y P388, mientras que el hidrolizado de caseína (HC) lo hace parcialmente y la albúmina no muestra efecto.
- El CasNa, el HC y la albúmina afectan la viabilidad en forma significativa, además de tener efecto citotóxico en forma dosis dependiente, solo para CasNa e HC.
- El CasNa e HC inducen diferenciación morfológica de formas monoblásticas hacia monocito-macrófagos y solo CasNa induce mayor actividad fagocítica en ambas líneas celulares.

PERSPECTIVAS

En estudios recientes del grupo de trabajo se ha mostrado que el CasNa tiene efecto sobre la hematopoyesis normal *in vitro* e *in vivo*, favoreciendo aumento en la proliferación de células mononucleadas (Silvestre et al., 2007; Silvestre, 2007; Domínguez, 2007), pero reducción en las líneas leucémicas J774 y P388; manteniendo en ambos casos el potencial diferenciador. Interesantemente este efecto diferencial no se ha observado con las moléculas actuales empleadas para combatir el cáncer; debido a que todas afectan tanto en células normales como tumorales (Green, 2005). Es importante seguir con estudios que permitan mostrar los efectos del CasNa en co-cultivos de células tumorales con células de médula ósea y así evaluar su efecto para purgar médula ósea de pacientes leucémicos. Por otro lado evaluar el efecto del CasNa en modelos de leucemia *in vivo*, ya que de corroborarse el potencial del CasNa para eliminar células leucémicas pero favorecer a las células normales, podría servir como la estrategia deseada para los tratamientos hemato-oncológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- ✚ Abe K., Matsuki N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res.* 38:325–329.
- ✚ Adams D., Hamilton D. (1989). The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol.* 2: 283.
- ✚ Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity.* 15: 659-69.
- ✚ Aschkenasy A. (1971). Effets compado de la caséine et de divers melanges aminoacides sur la restauration de lerythropoiése, de la neutropoiése et de la lymphopoiése chez des rats prepares par une privation prolongée de protéines. *Nouvelles études. Arch Sci Physiol.* 25: 415-430
- ✚ Baehner R., Boxer L., Davis J. (1976). The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood.* 48:309-313.
- ✚ Baron M. (2003). Embryonic origins of mammalian hematopiesis. *Exp Hematol.* 31: 1160-1169.
- ✚ Becker S., Warren M., Haskill S. (1987). Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J immunol.* 139:3703-3709.
- ✚ Borenfreud E., Babich H., Alguacil N. (1988). Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-the natural red (NR) and tetrazolium MTT test. *Toxicol in vitro.* 2:1-6.
- ✚ Buttker T., MucCubrey J., Owen T. (1993). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Methods.* 157 :233-40.

- ✚ Cadena G., Carpio F. (2007). Fisipatología de la coagulación en la leucemia promielocítica aguda. Hematología, Programa educativo AMEH, A.C., 97-99.
- ✚ Castro S. (2006). Fracciones de *Issertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis doctoral. PUJ. Facultad de Ciencias. Colombia.
- ✚ Chabance B., Marteau P., Rambaud J., Miglior D., Boynard M., Perrotin P., Guillet R., Jolles P., Fiat AM. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*. 80: 155-165.
- ✚ Cohn Z. (1968). The structure and function of monocyte and macrophages. *Adv. Immunol.* 9:163.
- ✚ Coleman A., Forest S., McNeil N., Kovalchuk A., Ried T., Janz S. (1999). Cytogenetic analysis of the bipotential murine pre-B cell lymphoma, P388, and its derivative macrophage-like tumor, P388D1, using SKY and CGH. *Leukemia* 13: 1592–1600
- ✚ Cousar J. The hematopoietic-lymphoid neoplasms: Principles of diagnosis En: Lee G., Foerster J., Lukens J., Paraskevas F., Greer J., Rodgers G. (1999). *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA. .
- ✚ Crocker J., and Burnett D. (2005). *La ciencia del diagnóstico de laboratorio* 2a ed. Aukland.
- ✚ David G Madoff (2005). Splenic arterial interventions: anatomy indications technical, considerations and potential considerations. *Radiographics*. (25): S191-S211
- ✚ Dexter T (1989). Haemopoietic growth factor. *Brit Med Bulletin* 45: 337-349.
- ✚ Dinezot F., Lang R., (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability. *J Immunol Meth.* 89: 271-277.
- ✚ Dominguez V. (2007). Efecto del (CasNa) en la hematopoyesis medular y extramedular de ratones BALB/c. Tesis de Maestría. FES-Zaragoza, UNAM.

- ✚ Fenaux P., Chomienne C., Degos L. (2001). All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol.* 38: 13-25.
- ✚ Ferrari M., Formasiero M., Isseta A. (1990). MTT colorimétrico assays for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *J Immunol Meth.* 131:165-172.
- ✚ Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Krieglstein J., Kissel T. (2002). *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials.* 24: 1121-1131.
- ✚ Fong W., Tse A., Poon., Wang C. (2004). Magnolol and honokiol enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *J Biochem Cell Biol.* 37:427-441.
- ✚ Foon K., Casciato D. (2000). Acute leukemia. *Manual of clinical oncology* 4th Ed. Philadelphia; Lippincott and Wilkins. 496-513.
- ✚ Frankel S., Eardley A, lauwers G, Weiss M, Warrell RP Jr. (1992). The "retinoic acid syndrome" in acute promyelocytic leukemia. *Ann Intern Med.* 117:292-296.
- ✚ Freshney R. (1994). *Culture of animal cells a manual of basic technique.* 3^{ra} edition, Wiley-Liss. NY. USA. 486 pp.
- ✚ Gill H S., Doull F., Rutherford K, Croos M. (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Brit J Nut.* 84: S111-S117.
- ✚ Gillies R., Didier N., Dentosn M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 159:109-113.
- ✚ Godfrey R., Wilder M. (1984). Relationships between oxidative metabolism, macrophage activation, and antilisterial activity. *J Leuk. Biol.* 36:533-543.
- ✚ Gordon S., Lawson L., Raabinovih R., Crocker P. (1992). Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissue. *Curr. Top. Microbiol. Inmmunol.* 181: 1-37.
- ✚ Green N. (2005). Pegfilgastrim: evidence in support of its use with cytotoxic chemotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 5:585-590.
- ✚ Gutiérrez M. (2006). Síndromes hematológicos. Su relación con las enfermedades que lo producen. *Edit. Prado* 473-491.

- ✚ Hao Q., Zhu J., Price M., Payne K., Barsky L., Croocks G. (2001). Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood*. 97:3683-3690.
- ✚ Harrington G., Perrino F (1995). The Effects of Cytosine Arabinoside on RNA-primed DNA Synthesis by DNA Polymerase α -Primase. *J Biol Chem*. 270: 26664–26669
- ✚ Henry R., Hoppe A., Joshi N., Swanson J. (2004). The uniformity of phagosome maturation in macrophages. *J Cell Biol*. 164: 2-10.
- ✚ Hirose A., Ikejima T., Gill D. (1985). Established Macrophagelike Cell Lines Synthesize Interleukin-1 in Response Toxic Shock Syndrome Toxin. *Infect Immun*. 50:765-770.
- ✚ Hoffman R., Benz E., Shattil S., Furie B., Cohen H., Silberstein L. (2000). Stem cell model of hematopoiesis. *Hematology: Basic principles and practice*. Philadelphia, EE. UU: Churcull Livingstone. 126-138.
- ✚ Holness C., daSilva R., Fawcett J., Gordon S. (1993). Macrosialin a mouse macrophage –restricted glycoprotein is a member of the lamp/Igp family. *J. Biol Chem*. 268: 9662-9666.
- ✚ Hope K., Jin L., Dick J. (2003). Human acute myeloid leukemia stem cells. *Arch Med Res*. 34: 496-506.
- ✚ Horny H-P., Ruck M., Kaiserling E. (1990). Immunohistology of human spleen after bone marrow transplantation for leukaemia with special reference to early post-transplantation period. *Pathol Res Pract*. 186: 775-783.
- ✚ Hughes-Jones NC. and Wickramasinghe E. (1991). *Lecture notes on haematology*. Blackwell Scientific Publications, London 225 pp.
- ✚ Ivanova N., Dimos J., Schaniel C., Hackney J., Moore K., Lamischka I. (2002). A stem cell molecular signature. *Science*. 298: 601-604.
- ✚ Jamieson C., Laurie P., Ailles E., Scott P., Dilla P. (2004). Granulocyte-Macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*. 351: 657-667.
- ✚ Jandl J (1991). *Blood: Pathophysiology*. 1ra ed. Blackwell Scientific Publications, Inc. USA.

- ✚ Kantarjian H., Dixon D., Keating D., Keating M., Talpaz M., Walters R., McCredie K., Freireich E. (1988). Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 61:1441-1446
- ✚ Kasukabe T., Okabe J., Honma Y., Hozumi M. (1987). Purification of a novel growth inhibitory factor for partially differentiated myeloid leukemic cells. *J Biol Chem*. 263: 5431-5435.
- ✚ Kasukabe T., Okabe J., Honma Y., Huzomi M. (1987). Production by undifferentiated myeloid leukemia cells of anovel growth-inhibitory factor(s) for partially differentiated myeloid leukemic cells. *J Cancer Res*. 78:921-931.
- ✚ Kaushansky K. (2006). Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*. 354: 2034-2045.
- ✚ Kon S. (1977). *La leche y los productos lácteos de la nutrición humana*. 2da. Ed. FAO, Rumania.
- ✚ Koren H., Handwerger B., Wunderlich J. (1975). Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *J Immunol*. 114: 894-897.
- ✚ Krause S., Rehli M., Kreutz M., Schwarzfischer L., Paulauskis J., Andreesen R. (1996). Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol*. 60: 540-545.
- ✚ Kueng W. Silber E. Eppenberger U. (1989). Quantification of cells cultured on 96 well plates. *Anal Biochem*. 182:16.
- ✚ Labardini J. (2006). Leucemia aguda mieloblástica. Tratamiento. *Hematología actualización*. Edit. AMEH, A.C. 63-66.
- ✚ Lahov and Regelson, (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol*. 34: 131-145.
- ✚ Lee R., Foerster J., Lukens J., Paraskevas F., Greer J., Rodgers G. Wintrobe's. (1999). *Clinical hematology*. Lippincott Williams & Wilkins. USA. Tenth edition. Vol. 1. 1482 pp.
- ✚ Lewis C., McGee J. (1992). *The Macrophage*. Oxford University Press. New York. 11-35.

- ✚ List A., Kopecky K., Willman C., Head D., Persons D., Slovak M. (2001). Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*. 98:3212-3220.
- ✚ Lönnerdal B. (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nut.* 177: 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: 93-100.
- ✚ Loveland B., Johns T., Mackay I., Vaillant F., Wang Z X., Hertzog P., Mackay I. R., Vaillant F., Wang Z., Hertzog P. (1992). Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochem Inter.* 27:501-510.
- ✚ McDonald G A., Paul J., Cruickshank. (1995). *Atlas of hematology*. 5^a edition. Panamericana. 227 pp.
- ✚ McIntosh G., Register G., Leu L., Rogle P., Smither G. (1995). Dairy protein protect against dimethylhydrazine induced intestinal cancer in rats. *J Nutr.* 125: 809-816.
- ✚ McDonald J., Paul B., Cruickshank B. (1989). *Atlas Hematology*. 5^a ed.. G.A.
- ✚ Meisel H (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43:119:128.
- ✚ Meisel H. and Bockelmann W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 207-215.
- ✚ Meltzer M., Occhionero M., Ruco L. (1982). Macrophage activation for tumor cytotoxicity: regulatory mechanisms for induction and control of cytotoxic activity. *Fed Proc*. 41: 2198-2205
- ✚ Metcalf D (1999). Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: Are our dogmas correct?. *Annals NY Acad Sci*; :289-302.
- ✚ Metcalf D. (1971). Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro*. *J Cell Physiol*. 77:277.

- ✚ Metcalf D. (1993). Hematopoietic regulators : Redundancy or subtlety?. Blood 82: 3515-3523.
- ✚ Metcalf D. (1998). Cell-Cell signaling in the regulation of blood cell formation and function. Immunol Cell Biol 76: 441-447.
- ✚ Metcalf D., Burgess AW. (1982). Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. J Cell Physiol 111:275.
- ✚ Metcalf D., Robb L., Dunn A., Mifsud S., Rago L. (1996). Role of Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and Granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. Blood. 88: 3755-3764.
- ✚ Moore M. (1991). Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. Blood 78:1
- ✚ Morrison S., Uchida N and Weissman I (1995). The biology of hematopoietic stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol. 11: 37-71.
- ✚ Munker R. (2000). Modern hematology. 1ra ed. Human Press USA.
- ✚ Munker R. Hiller E. Paquette R. (1998). Modern hematology. Biology and clinical management. Human Press, New Jersey. 369 pp.
- ✚ Muñoz L. (2005). Estudio del efecto de péptidos de caseína en la proliferación y diferenciación de las células 32D y WEHI-3. Tesis Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM.
- ✚ Nancy C., Belosevic M., Crawford R., Haely A., Schreiber R., Meltzer M. (1988). Lymphokine regulation of macrophage effector activities. In: Host Defense Immunomodulation to intracellular pathogens. Eisenstein T, Bullock W, Hanna N (eds). Plenum Press New York.
- ✚ Niato M., Takahashi K., Nishikawa S. (1990). Development, differentiation, and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. J Leukoc Biol. 48:27-37.
- ✚ Ogawa M. (1993). Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. Blood. 81:2844-2853.

- ✚ Ogawa M., Matsunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci.* 872: 17-23.
- ✚ Okano M., Ohnota M., and Sasaki R. (1992). Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J Nut.* 122: 1376-1383.
- ✚ Orkin SH. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem.* 270: 4955-4958.
- ✚ Orlic D and Bodine DM. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up?. *Blood.* 84: 3991-3994.
- ✚ Osorio G. (1987). Leucemias agudas: clasificación y diagnóstico morfológico. *Bol. Hosp. San Juan de Dios.* 34:357-66.
- ✚ Pasotti D., Mazzone A., Lecchini S., Frigo G., Ricevuti G. (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol.* 15: 71-81.
- ✚ Passege E., Wagers A., Guiriato S., Anderson W., Weissman I. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem cell and progenitor cell fates. *J Exp Med.* 202:1599-1611.
- ✚ Passegue E., Wagers A., Giuriato S., Anderson W., Weissman I. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med.* 202:1599-1611
- ✚ Passotti D., Mazzone A., Lecchni S., Frigo G. (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol.* 2: 71-81
- ✚ Platt W. (1982). *Atlas Hematología a color.* 2ª ed. , Barcelona.
- ✚ Prosper F. and Catherine M. Verfaillie. (2001). Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leuk Biol.* 69: 307-313.
- ✚ Quesenberry P., Colvin G., Lambert J. (2002). The chiaroscuro stem cell: A unified stem cell theory. *Blood ;* 1000:4266-4271.

- ✚ Ralph P., Moore M., Nilsson K. (1976). Lysozime synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med.* 143: 1528-1533.
- ✚ Ralph P., Prichard J., Cohn M. (1975). Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. *J Immunol.* 114:898-905
- ✚ Ramos G. (2004). Efecto de caseínas y casomorfinas en la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mieloides 32D y WEHI-3. Tesis Doctoral. FES-Zaragoza, UNAM.
- ✚ Ramos G., Santiago E., Martínez I., Zambrano I., Manrique B., Weiss B. (2000). El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Inv Clin* 52: 638.
- ✚ Ramos G., Weiss B., Córdova Y., Hernández J., Zambrano I., Santiago E. (2004). Sodium caseinate induces the murine multipotent myeloid cell line 32D to express and secrete the macrophage colony stimulating factor (M-CSF). *Arch Med Res.* 109: 113
- ✚ Ramos G., Weiss B., Melo B., Córdova Y., Ledesma E., Bustos S., Silvestre O., **Aguñiga I.**, Sosa N., Sánchez L., García A., Santiago E. (2008). Alpha, beta and kappa caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiol.* 213: 133-141
- ✚ Rojas O., Arce P. (2003). Fagocitos: mecanismos y consecuencias, primera parte. *Bioquimia.* 28:19-30.
- ✚ Rojas O., Arce P. (2004). Fagocitos: mecanismos y consecuencias, segunda parte. *Bioquimia.* 29:18-31.
- ✚ Rojas O., Paredes P. (2004). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias . Tercera parte. *Bioquimia.* 29:55-67.
- ✚ Sánchez M., Holmes A., Miles C., Dzierzak E. (1996). Characterization of the First Definitive Hematopoietic Stem Cells in the AGM and liver of the Mouse Embryo. *Immunity.* 5:513-525.
- ✚ Santiago E., Mora L., Bautista., Montesinos J., Martínez I., Ramos G., Zambrano R., Monroy A., Weiss B., Ledesma M., Aguiñiga I. (2008). Sodium caseinate induces secretion of macrophages colony-stimulating for from neutrophils. *J Immunol.* (sometido).

- ✚ 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 fibroblasts. *Rev Invest Clin; Supl-1*: 253.
- ✚ Shamay A., Shapiro F., Leitner G., and Silanikove N. (2003). Infusions of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupt tight junction integrity and induce involution in cows. *J Dairy Sci.* 86: 1250-1258.
- ✚ Sieff C. (1990). Biological and clinical aspects of the hematopoietic growth factors, *Annu Rev Med.* 41: 483-496.
- ✚ Silvestre O. (2007). La inyección de CasNa en ratones BALB/c induce la proliferación y diferenciación de células de médula ósea de raón del linaje mieloide y linfoide. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM.
- ✚ Silvestre O., Fajardo G., Rogues L., **Aguñiga I.**, Weiss B., Santiago E. (2007). El caseinato de sodio aumenta la proliferación de células de médula ósea de ratón inducidas por interleucina 3. XLVIII Congreso Anual de la Agrupación Mexicana par el estudio de la Hematología A.C.. Acapulco, Gro.
- ✚ Tallman M, Gilliland D, Rowe J. (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*; 106:1154-1163.
- ✚ Tatura M., Lishi H., Baba M., Taniguchi H. (1992) Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in wistar rats fed a low-protein diet. *Int J Cancer.* 50: 108-111.
- ✚ Teji3n A., Garrido A., Blanco M., Villaverde C., Mendoza C., Ramir3z J. (2006). *Fundamentos de Bioqu3mica Metab3lica.* Edit. Tebar. 18-30.
- ✚ Toles J., Chui D., Belbeck L., Starr E., Barker J. (1989). Hemopoietic stem cells in murine embryonic yolk sac and peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 7456-7459
- ✚ Tominaga H., Ishiyama M., Ohseto F., Sasamoto K., Hammamoto T., Suzuki F., Watanabe M. (1999). A water-soluble tetrazolium SALT useful for colorim3trico cell viability assay. *Anal Commun.* 36:47-50
- ✚ Van Furth R. (1978). Mononuclear phagocytes in inflammation. In: *Handbook of Experimental pharmacology. Inflammation and anti-inflammatory drugs.* Springer Verlang, Heidelberg. 50: 68-

- ✚ Van Furth R., Sluiter W. (1985). Macrophages as autoregulators of mononuclear phagocyte proliferation. In: Macrophage biology. New York; 11.
- ✚ Wakelin L., Adams A., Hunter A., Waring J. (1981). Interaction of crystal violet with nucleic acids. *Biochemistry*. 20: 5779-5787
- ✚ Walstra P and Jenneis R (1984). Dairy chemistry and physics. John Wiley Sons, New York.
- ✚ Warrell R. (1993). Acute promyelocytic leucemia. *N Engl J Med*. 329:177-189.
- ✚ Weisman I. (2000). Stem cell: units of development, unit of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100: 157-168.
- ✚ Wiley S., Jones P., Sawyer W., Paterson A. (1982). Cytosine Arabinoside Influx and Nucleoside Transport Sites in Acute Leukemia. *J. Clin. Invest*. 69: 479-489
- ✚ Wintrobe M. (1981). *Clinical Hematology*. 8^a ed. , Philadelphia.
- ✚ Yorder M. (2001). Introduction: spatial origin of murine hematopoietic stem cells. *Blood*. 98: 3-5.
- ✚ Zambrano I, Santiago O, Weiss S, Cáceres C. (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev Inv Clin*. 51: 53-66.
- ✚ Zuckerman K., Prince C., Gay S. (1989). The hematopoietic extracellular matrix, en tavassoli M (ed.). *The handbook of the hematopoietic microenvironment*. Humana Pre RRTnc 39.

APÉNDICE

Apéndice A

I.- Preparación de Medio Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM)

Preparación en un litro de agua-milliQ
Iscove's 17.7 g (un sobre aproximadamente)
Penicilina 0.031g
NaHCO₃ 3.024g
pH 6.9-7

Esta solución se esteriliza por medio de una membrana (Millipore) con un diámetro de 0.22 µm. Conservar en refrigeración a 4°C.

II.- Inactivación del suero fetal bovino (SFB)

El suero fetal bovino SFB (Gibco BRL, USA) congelado se coloca a temperatura ambiente para su descongelación, posteriormente se pasa a un baño de agua a 56° durante 30 minutos, con el propósito de inactivar proteínas del complemento. Posteriormente se separan en alícuotas, para su mejor manipulación, conservándose a 4°C.

III.- Solución estabilizadora de fosfatos (PBS)

Esta solución de sales de fosfatos proporcionan la capacidad estabilizadora a esta solución, y se compone de:

- ◆ Cloruro de magnesio (MgCl₂)(Sigma, Chem, USA) 0.10 g
- ◆ Cloruro de calcio (CaCl₂)(Sigma, Chem, USA) 0.10 g
- ◆ Cloruro de sodio (NaCl)(Sigma, Chem, USA) 8.00 g
- ◆ Cloruro de potasio (KCl)(Sigma, Chem, USA) 0.20 g
- ◆ Fosfato monoácido de sodio (Na₂HPO₄)(Sigma, Chem, USA) 2.16 g
- ◆ Fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄)(Sigma, Chem, USA) 0.20 g

El cloruro de magnesio y cloruro de calcio se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se disuelven en 800 mL de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el pH de 7.2 a 7.5 utilizando ácido clorhídrico 8N (Sigma, Chem, USA), y se afora a un volumen final de 1000 mL. Esta solución se esteriliza por autoclave, la solución se almacena a una temperatura de 4°C.

Apéndice B

I.- Preparación de Glutaraldehído al 1%

A 1.57 mL de glutaraldehído (70% v/v) se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada. La solución de glutaraldehído al 1% se conserva a temperatura ambiente.

II.- Preparación de solución cristal violeta.

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1 % en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6 que se prepara al disolver 3.96g de NaOH a 4.28 mL de ácido fórmico. Una vez preparada esta solución se adiciona 1 g de cristal violeta y se afora a 500 mL con agua bidestilada. Finalmente, la solución cristal violeta se filtra usando papel Whatman #2 y se almacena a temperatura ambiente.

II.- Preparación de ácido acético al 10%.

A 10 mL de ácido acético glacial se le agregan 90 mL de agua bidestilada.

Apéndice C

Monoblasto

El núcleo grande redondo u oval, cromatina laxa de color púrpura.

Membrana uniforme

Citoplasma abundante, de color azul plomizo y no granulado.

La relación núcleo citoplasma es de 2:1.

Promonoblasto

Núcleo grande ovoide o redondo, contorno irregular con pliegues, cromatina irregular.

Citoplasma relativamente amplio, fina granulación azurofila de color gris-claro menor que monoblastos.

La relación núcleo citoplasma es de 1:2

Monocito-Macrófago

Núcleo puede ser excéntrico o central de tamaño variable, presenta forma arriñonada dentado o doblado (en forma de cerebro), presenta finas franjas de cromatina de color púrpura claro.

Citoplasma es muy abundante, opaco, gris azulado, desigualmente teñido, presentan vacuolas variables.

El citoplasma puede presentar pseudopodos.

La relación núcleo citoplasma es 1:4.

(Wintrobe, 1981; Platt, 1982; McDonald *et al.*, 1989; Crocker & Burnett, 2005).

PUBLICACIONES Y CONGRESOS



50 años
1959 - 2009

Nuestro Directorio
2007 - 2009

Dr. Luis Sánchez Madrid Y
Fundador

Dr. Raúl Carrero Castellanos
Presidente

Dr. David Gómez Almaguer
Vicepresidente

Dr. Luis Martín Laurca Pila
Secretario

Dr. Hernán Madrid Santiago
Tesorero

Dr. Eduardo Terreros Muñoz
Vocal de Act. Científicas

Dr. Oscar de Jesús Pérez
Vocal de Membresía

Comités:

Hematología Médica
Dr. Juan Labarede Méndez

Hematología Inmunológica
Dr. Sergio Sánchez Guerrero

Hematología de Cabeza
Hematopatías
Dr. Gregorio Ignacio Barera

Hematología Pediátrica
Dr. Rogelio A. Fandiño Aguilera

Hematología y Transfusión
Dr. Jaime García Chávez

Sociedad Incorporada
Asociación Mexicana de
Hematología, A.C.
Dr. Hernán Madrid Santiago

Se otorga la presente

CONSTANCIA

Santiago-Ochoa E, Rojas R, Bustos C,
Aguilera-Sánchez J, Ledezma E, Córdoba Y.

Por su participación con el trabajo

"EL CASEINATO DE SODIO INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE LÍNEAS LEUCÉMICAS DEL LINAJE MONOCITO-MACRÓFAGO"

Presentado en el XLIX CONGRESO Anual de esta Asociación,
evento realizado del 30 de abril al 3 de mayo de 2008, en Monterrey,
Nuevo León, México.

Dr. Raúl Carrero Castellanos
Presidente

Dr. Luis Martín Laurca Pila
Secretario

Dr. Eduardo Terreros Muñoz
Vocal de Act. Científicas

San Francisco 1626-406 Col. Del Valle 03100 México, DF
Tel: (55) 55 24 11 12. M/Fax: (55) 55 24 18 26. email: 20009@hematologia.mx www.smh.org





Mesa Directiva
2007-2007

Dr. Luis Sánchez Nolasco
Fundador

Dr. Julio E. Selva Pallares
Presidente

Dr. Ramón A. Gómez García
Vicepresidente

Dr. Raúl Cano Castellanos
Vicepresidente

Dra. Ma. Antonieta Vélez Ruelas
Secretaria

Dr. Antonio Luis López
Tesorero

Dr. David Gómez Amador
Vocal de Act. Científicas

Dr. Oscar Hernández Zamudio
Vocal de Honorario

San Francisco 1826-406,
Col. San Vito, 03100
México, D.F.
Tel. (55) 5524-1112
(55) 5524-1854
Fax: (55) 5524-2854
e-mail: amhe@amhe.org.mx
www.amhe.org

Se otorga la presente

CONSTANCIA

*Silvestre G. Fajardo GR, Rogues L, Aguirre L, Weiss B,
Santiago E.*

Por su participación con el trabajo:

***"SOLO EL CASEINATO DE SODIO AUMENTA LA
PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA
DE RATÓN INDUCIDA POR INTERLEUCINA 3."***

Presentado en el ***XLVIII CONGRESO Anual*** de esta
Agrupación, evento realizado del 2 al 6 de mayo de
2007, en Acapulco, Guerrero, México.

Dr. Julio E. Selva Pallares
Presidente

Dra. Ma. Antonieta Vélez Ruelas
Secretaria



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Immunobiology 213 (2008) 133–141

Immunobiology

www.elsevier.de/imbio

Alpha-, beta- and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties

G. Ramos-Mandujano^{a,b}, B. Weiss-Steider^a, B. Melo^a, Y. Córdova^a,
E. Ledesma-Martínez^a, S. Bustos^a, O. Silvestre^a, I. Aguiñiga^a, N. Sosa^a,
I. Martínez^a, L. Sánchez^a, A. García^a, E. Santiago-Osorio^{a,*}

^aLaboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de mayo s/n, Col. E. Oriente, Iztapalapa, CP 09230, México, DF, México

^bDepartamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad Universitaria, CP 04510, México, DF, México

Received 17 November 2006; received in revised form 22 June 2007; accepted 17 July 2007

Abstract

We have recently shown that sodium caseinate (CasNa) was able to inhibit the proliferation of the myeloid cell line 32D cl3 in a non-toxic way, and that it also induced the expression of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). Casein is the main protein present in milk and is composed of alpha (α), beta (β) and kappa (κ) subunits. This work was undertaken to evaluate if any one casein is responsible for the proliferation and differentiation properties found for CasNa on myeloid cells. Taking into consideration that 32D cl3 cells are considered to be non-malignant and dependent on IL-3 for proliferation, we also included for this study a leukemic cell line, WEHI-3, that does not depend on any external growth factor for its proliferation in order to evaluate if the growth inhibitory effect of caseins is also present for malignant cells. Our results showed that all caseins were inhibitory for the proliferation of either 32D cl3 and WEHI-3 and that only the 32D cl3 cells were induced to differentiate into the monocyte-macrophage lineage. In order to evaluate if CasNa was able to inhibit the proliferation of other myeloid cells we used J774 and P388 and found that they were also inhibited. We also determined that the different caseins exhibit different differentiation properties, with α -casein being the only one able to induce the secretion of M-CSF. We consider this work to open a new field of research, where casein, or its components, can be studied for their possible role in hematopoiesis and on the inhibition of malignant cell proliferation for therapeutic use.

© 2007 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Casein; Differentiation. Hematopoiesis; Leukemia; Macrophage; M-CSF

Abbreviations: BMC, bone marrow cells; CasNa, sodium caseinate; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; Gr-1, Ly-6G granulocyte antigen specific; IL-3, interleukin-3; IMDM, Iscove's Modified Dulbecco's Medium; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; M-CSFR, macrophage colony-stimulating factor receptor; PBS, phosphate-buffered saline; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction

*Corresponding author. Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia (L-8), UMIE, FES-Zaragoza campus II. Batalla 5 de mayo s/n, Col. Ejercito de Oriente, Iztapalapa, CP 09230, México, DF., México. Tel./fax: + 52 55 5773 4108.

E-mail address: edelmiro@servidor.unam.mx (E. Santiago-Osorio).

0171-2985/\$ - see front matter © 2007 Elsevier GmbH. All rights reserved.

doi:10.1016/j.imbio.2007.07.004

Introduction

Sodium caseinate (CasNa), a salt of casein and the main protein of milk, was used more than 20 years ago to produce an inflammatory response in the peritoneal cavity of mice (Lotem and Sachs, 1983). For this purpose, CasNa inoculation was performed intraperitoneally and the cells were harvested at different times. Granulocytes appeared in great numbers only 16 h after the inoculation, followed several days later by monocyte and lymphocyte migration (Lotem and Sachs, 1983, 1985).

Soon afterwards, the presence of several growth factors, like macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), granulocyte-CSF (G-CSF) and granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF), were discovered in high concentrations in the sera of those mice treated with CasNa or casein (Lotem and Sachs, 1985; Metcalf et al., 1996). Actually, it was from these sera that the first hematopoietic growth factors were first discovered, purified and studied (Sachs, 1990). Now that recombinant growth factors are available (Kaushansky, 2006), inoculation with CasNa or casein has remained a good inducer of inflammatory cells in the peritoneal cavity of mice (Metcalf et al., 1996).

Our laboratory has recently shown that CasNa is an inhibitor of myeloid cell proliferation and a good inducer of their differentiation along the monocyte macrophage lineage (Ramos et al., 2000). In fact, 32D cl3 cells were inhibited in their *in vitro* growth in a dose-dependent way and the expression of mRNA for M-CSF was also induced (Ramos et al., 2004).

Casein is formed by alpha (α)-, beta (β)- and kappa (κ)-casein subunits (Meisel, 2005). A couple of those casein subunits have been shown to have several regulatory properties on lymphoid cells. For example, κ -casein can block splenocyte mitogenesis (Otani et al., 1992; Otani and Hata, 1995), while β -casein can help in the induction of proliferation of B and T lymphocytes (Wong et al., 1996); however, we do not know if some casein subunits can also modulate myelopoiesis.

This work was undertaken to evaluate the possible regulatory properties of the different caseins on cell proliferation and differentiation of myeloid cells. For this purpose, a mouse normal myeloid cell line dependent on interleukin-3 (IL-3) for its proliferation, 32D cl3, was used, as well as a leukemic myelomonocytic cell line, WEHI-3.

Materials and methods

Cytokines and antibodies

Recombinant mouse interleukin-3 (rmIL-3), recombinant mouse interferon gamma (rmIFN- γ), recombinant mouse macrophage colony-stimulating factor (rmM-CSF), anti-rmM-CSF purified goat IgG and a kit for

M-CSF ELISA were purchased from R&D Systems (MN, USA). Anti-fms (M-CSFR extracellular domain), goat anti-rabbit IgG (H+L) fluorescein conjugate (Upstate, NY, USA) and FITC-conjugated rat anti-mouse Ly6G (Gr-1) were purchased from BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, USA).

Cell culture

The mouse IL-3-dependent myeloid cell line 32D cl3 (Greenberger et al., 1983) was a kind gift from T. Hoang (Hemopoiesis and Leukemia Laboratory, Montreal, Quebec, Canada). The mouse myelomonocytic leukemia cell line WEHI-3, the macrophage leukemia cell line J774 and P388 were purchased from ATCC (VA, USA). The cells were cultured in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C, in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Gibco BRL, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, HyClone, Utah, USA). Additionally, media for the 32D cl3 cell line was supplemented with 0.5 ng/mL of rmIL-3.

Cell proliferation assays

To evaluate cell proliferation, twenty thousand 32D cl3, J774, P388 or WEHI-3 cells were cultured for 48 h with or without CasNa (Difco Laboratories, USA) or α -, β - or κ -casein (Sigma, México) in 96-well plates (Costar, Cambridge, MA, USA). After this time, 0.5 μ Ci/ml of ³H-thymidine (activity 185 mBq; Amersham Pharmacia Biotech, UK) was added, and cells were harvested 24 h later, washed once with PBS and lysed in NaOH (0.4 M). Finally, 2 mL of scintillation liquid was added and samples were analyzed in a Beckman beta-counter (Beckman LS6500, USA). The conditioned media (CM) collected at 72 h of culture without ³H-thymidine were stored at -70 °C.

Cell viability

To determine the presence of necrotic cells, 32D cl3 or WEHI-3 cells were cultured for 72 h with or without CasNa or α -, β - or κ -casein in 96-well plates. 20 μ L of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (5 mg/mL saline) was added to each well and the samples were incubated for 4 h at 37 °C. The cells were lysed and solubilized by the addition of 100 μ L of 0.04 N HCl in isopropanol. The absorbance was determined at 590 nm with a microplate reader (Tecan Spectra, Austria).

Cellular differentiation

In order to identify different cellular lineages, specific cytochemistry stains were used, with α -naphthyl acetate

esterase for monocyte-macrophages and chloroacetate esterase for granulocyte-neutrophils (Li et al., 1973).

To assess further the differentiation of 32D cl3 and WEHI-3 cells in response to casein, expression of the macrophage cell surface marker c-fms (macrophage colony-stimulating factor receptor (M-CSFR)) (Anderson et al., 1982) and granulocyte Gr-1 (Hestdal et al., 1991) were examined using flow cytometry. Briefly, 5×10^5 cells were incubated with a specific antibody at a concentration of 10 mg/mL for 30 min at 4 °C and washed with fluorescence-activated cell sorter buffer (phosphate-buffered saline (PBS), 2% FCS, 0.1% BSA, 0.01% NaN₃) 2 times. Thereafter, cells were incubated with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled secondary antibody for 30 min. Fluorescence was analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) according to the standard procedures.

Assay for Fc receptors (FcR)

The Fc receptors (FcR) were evaluated by means of a variation of the EA rosette technique (Bianco et al., 1970). Briefly: anti-sheep red blood cells (SRBC) rabbit IgG (Sigma) was diluted 1:1600 in PBS and mixed with a non-agglutinating concentration of SRBC previously washed in PBS, and incubated at 37 °C for 30 min. The erythrocytes coated with antibody (EA) were washed 3 more times in PBS to remove free IgG and stored in PBS for a maximum of 5 days at 4 °C until used. 5×10^5 32D cells were mixed with EA at a concentration of 100 red cells for each white cell, adjusted to 1 mL and incubated at 37 °C for 30 min. Finally, the cellular pellet was gently dispersed with a pipette in cold IMDM and the white cells with more than 3 attached erythrocytes were considered as rosettes. A minimum of 300 cells were counted for every determination.

Colony-forming assay

To obtain bone marrow cells (BMCs) from female mice strain CD1, IMDM was flushed through individual mouse femoral shafts using a syringe. The cells from bone marrow were pooled, washed 3 times by centrifugation in IMDM medium and then resuspended in 2 mL of IMDM containing 10% (v/v) of FBS.

For the colony-forming assay, the double-agar layer technique was employed (Pluznik and Sachs, 1966). Briefly, a first layer with 0.6% (w/v) agar containing IMDM medium, 20% (v/v) horse serum (HS) and either 20 ng/mL rmM-CSF or 20% (v/v) of each CM to be tested was layered; a second layer with 0.3% (w/v) agar, IMDM medium and 10% HS (v/v) was overlaid with 1×10^5 BMCs per well. After 7 days of incubation, all the colonies with more than 20 cells were counted using an inverted microscope.

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

ELISA assay

The presence of M-CSF in the supernatants from cultures of 32D cl3 cells treated with different caseins was measured using an ELISA assay according to the manufacturer's (Mouse M-CSF Immunoassay, R&D) instructions. The plates were read at 450 nm in a plate reader (Tecan Spectra, Austria).

RT-PCR mRNA assay for M-CSF and the M-CSF receptor

The 32D cl3 cells were analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for expression of M-CSF and the M-CSF receptor mRNAs. For this purpose, total RNA was isolated with Trizol (Trizol reagent, Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Briefly, 32D cl3 cells (1×10^6) were cultivated in the presence or absence of 1 mg/mL CasNa or α -, β - or κ -casein. The cells were then washed with PBS with 1 mL of Trizol and 200 μ l of chloroform added. The aqueous phase was collected and mixed with 500 μ l isopropyl alcohol, and the precipitated RNA was placed in 15 μ l of DEPC-treated H₂O. Subsequently, the RNA (1 μ g) was reverse-transcribed (RT) with 25 U/mL of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Perkin-Elmer, GeneAmp RNA PCR N808-0017, New Jersey, USA). The RT was performed with incubations for 60 min at 42 °C and 10 min at 90 °C. The resulting complementary DNA (cDNA) was amplified by standard PCR (105 s at 95 °C, 35 cycles of 15 s at 95 °C and 30 s at 60 °C, 7 min at 72 °C) in a thermal cycler (Techne Model FGEN05TP, New Jersey, USA). PCR products were subsequently visualized by agarose gel electrophoresis (2%) containing ethidium bromide. The RT-PCRs were normalized for β -actin.

The primers used in the PCR for M-CSF were 5'-TCG ACA TGG CTG GGC TCC C-3' and 5'-ATC AGG CTT GGT CAC CAC ATC-3', while the primers for the M-CSF receptor were 5'-TTG TAC CGA GCT TGA AGA CCC-3' and 5'-AGC GTT GAG ACT GAG AGC CC-3'; these primers amplify 527 bp and 552 bp fragments, respectively (Raivich et al., 1998). For β -actin, the primers 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3' and 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' were used; these primers amplify a 238 bp fragment.

Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. Statistical significance was assessed using a

Student's *t*-test. All the biochemicals were from Sigma Chemical Co (St Louis, MO), unless otherwise specified.

Results

CasNa and α -, β - and κ -caseins differentially inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3

In order to evaluate if CasNa and its components, the α -, β - or κ -caseins, could inhibit the cellular proliferation of the 32D cl3 and WEHI-3 cell lines, cells were cultured in the presence of 0, 0.01, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/mL of each molecule at a cell density of 2×10^4 and 3×10^3 cells per mL, respectively; rmIL-3 (0.5 ng/mL) was also routinely added to the 32D cl3 cell cultures to induce survival and proliferation.

Our results showed that CasNa was an inhibitor of 32D cl3 proliferation at a dose of 0.1 mg/mL (Table 1A). Interestingly, the caseins presented different inhibition characteristics. While the β -casein had almost no inhibition capability, the α - and κ -caseins were strong inhibitors, although less than CasNa, starting at 0.5 mg/mL. In contrast, CasNa was the molecule with less inhibitory capabilities on WEHI-3 cells than the other caseins (Table 1B), with κ -casein the most powerful one, presenting a strong inhibition even at 0.5 mg/mL. When 10 ng/mL of rmIFN- γ was used as a control for proliferation there was a $42 \pm 9.1\%$ inhibition. Neither

Table 1. Cell proliferation of 32D cl3 and WEHI-3 cell line treated with casein

mg/mL	Cell proliferation (%)			
	CasNa	α	β	κ
(A)				
0	100 \pm 10.5	100 \pm 7.9	100 \pm 6.1	100 \pm 7.2
0.01	101 \pm 11.2	93 \pm 11.6	94 \pm 5.7	102 \pm 9.0
0.1	51 \pm 25.0*	94 \pm 9.8	91 \pm 4.5*	101 \pm 14.2
0.5	36 \pm 23.0*	88 \pm 12.0*	92 \pm 8.1*	80 \pm 19.7*
1	22 \pm 20.0*	58 \pm 23.8*	82 \pm 10.9*	43 \pm 25.0*
(B)				
0	100 \pm 7.7	100 \pm 10.6	100 \pm 11.6	100 \pm 6.0
0.01	95 \pm 6.5	104 \pm 13.3	108 \pm 12.5	103 \pm 9.5
0.1	104 \pm 6.2	106 \pm 9.8	104 \pm 12.0	96 \pm 5.0
0.5	99 \pm 16.9	89 \pm 16.0	90 \pm 13.1	67 \pm 15.9*
1	86 \pm 9.0*	73 \pm 12.2*	71 \pm 11.6*	32 \pm 19.0*

Percentage of proliferation of 32D cl3 (A) and WEHI-3 (B) cells treated with either sodium caseinate (CasNa), α -casein (α), β -casein (β) or κ -casein (κ) after 3 days of incubation. The results are expressed as a mean \pm SD from cultures without casein. *Results are significantly different ($P < 0.05$) from that of the control (0 mg/mL), as determined by Student's *t*-test.

Table 2. Cell viability of 32D cl3 and WEHI-3 cell line treated with casein

mg/mL	Cell viability (%)			
	CasNa	α	β	κ
(A)				
0	98 \pm 1.8	99 \pm 0.7	99 \pm 0.7	97 \pm 1.5
0.01	98 \pm 1.4	99 \pm 0.6	99 \pm 0.5	98 \pm 1.3
0.1	98 \pm 1.3	99 \pm 0.4	99 \pm 1.3	98 \pm 1.5
0.5	98 \pm 1.6	99 \pm 0.5	99 \pm 0.5	99 \pm 1.3
1	94 \pm 3.6	99 \pm 1.0	98 \pm 2.1	99 \pm 1.4
(B)				
0	98 \pm 1.4	99 \pm 1.1	98 \pm 0.3	99 \pm 0.1
0.01	98 \pm 1.2	98 \pm 0.9	98 \pm 0.3	98 \pm 0.1
0.1	98 \pm 1.6	98 \pm 1.2	98 \pm 0.2	98 \pm 0.3
0.5	98 \pm 1.9	98 \pm 1.0	97 \pm 0.4	94 \pm 1.5
1	97 \pm 0.9	96 \pm 1.5	92 \pm 1.5	89 \pm 2.6

Percent viability of 32D cl3 (A) and WEHI-3 (B) cell lines treated with sodium caseinate (CasNa), α -casein (α), β -casein (β) or κ -casein (κ) after 3 days of incubation, as determined by MTT assay. Results are expressed as a mean \pm SD from cultures without casein.

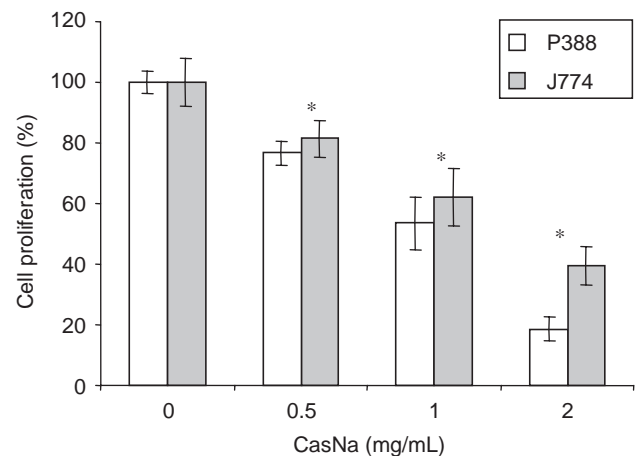


Fig. 1. Percentage of proliferation of P388 and J774 cells treated with 0, 0.5, 1 and 2 mg/mL of sodium caseinate (CasNa) after 3 days of incubation. The results are expressed as a mean \pm SD from cultures without casein. *Results are significantly different ($P < 0.05$) from that of the control (0 mg/mL), as determined by Student's *t*-test.

CasNa nor the caseins reduced cell viability below 90% at the doses employed (Table 2).

In order to evaluate if CasNa was also capable of inhibiting the proliferation of other myeloid cells, we cultured the J774 and P388 cell lines in the presence of 0.5, 1 and 2 mg/mL of CasNa and found that they were significantly inhibited (Fig. 1).

In order to determine if the inhibitory effect of CasNa was in fact due to a protein, we treated the CasNa sample with trypsin for 30 min at 37 °C and found that the inhibitory activity was eliminated (Fig. 2). Thus we

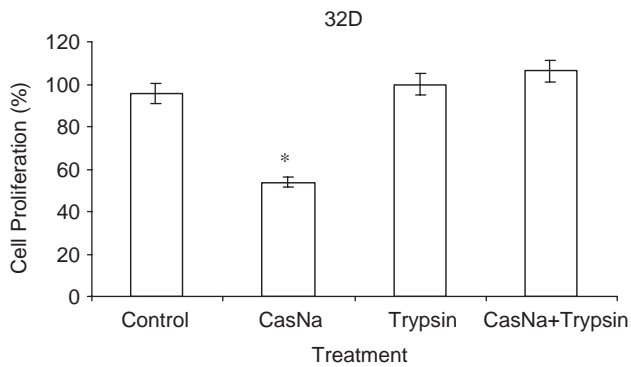


Fig. 2. Percentage of proliferation inhibition induced on 32D cl3 cells after 3 days of incubation with 1 mg/mL of CasNa that was autoclaved for 20 min at 120 °C and treated with (CasNa/Trypsin) and without (CasNa) 0.05% of trypsin (60 min at 37 °C). Controls with only IL-3 (Control) and IL-3 with trypsin (Trypsin) were also added. The results are expressed as a mean \pm SD. *Results are significantly different ($P < 0.05$) from that of the control as determined by Student's *t*-test.

can be fairly certain that the molecule with the inhibitory activity is in fact a protein.

On the other hand, taking into consideration that casein is the only protein in milk that does not denature at high temperatures (Swartz et al., 1992), we proceeded to autoclave the casein sample for 20 min at 120 °C and found that all the inhibitory activity was still present (Fig. 2). Finally, by using the specific property of casein that at high temperatures it is the only milk protein that forms aggregates (Lorient and Alais, 1970), we centrifuged the autoclaved sample at 9000g for 10 min in order to precipitate the fraction that was aggregated and proceeded to thoroughly wash away all the other molecules in suspension. Once again we found that the inhibitory activity was present in this precipitate. Thus we can be fairly sure that the casein is in fact the molecule responsible for the inhibitory activity we obtained on myeloid cell proliferation.

On the other hand, we also cultured the cells in the presence of 10–300 ng/mL of LPS from *Salmonella typhimurium* and found no inhibitory activity induced by this molecule.

CasNa and the α -, β - and κ -caseins induced cell differentiation towards the monocyte-macrophage lineage in 32D cl3 cells, while they could not induce differentiation in WEHI-3

Once the inhibitory capabilities of CasNa and the caseins in the proliferation of 32D cl3 and WEHI-3 were established, we proceeded to evaluate if they could also induce cell differentiation. For this purpose, we cultured

the cell lines in the presence of 1 mg/mL of each casein under the same conditions as those used for cell inhibition. To evaluate the differentiation towards the macrophage lineage, we used the specific cytochemical stain for α -naphthyl acetate esterase and also evaluated the expression of the membrane receptor for M-CSF (M-CSFR; also known as c-fms proto-oncogene), while for granulocytes, we used the cytochemical stain for chloroacetate esterase and the expression of the Ly-6G (Gr-1) membrane receptor.

Our results showed that CasNa and all the caseins were able to induce a strong differentiation to the macrophage lineage in 32D cl3 cells, while they could not induce any significant type of myeloid differentiation in WEHI-3 (Table 3A, B). It is interesting to note that, once again, there were different capabilities for induction of differentiation between CasNa and the caseins, with κ -casein being by far the weakest one (Table 3A). When 10 ng/mL of rmIFN- γ was used as a control for differentiation, a $33 \pm 11.7\%$ induction towards macrophage morphology was obtained. As far as the expression of cell receptors is concerned, CasNa and the α - and β -caseins induce M-CSFR, but CasNa was the best inducer for it (Table 3A). On the other hand, a small induction of the granulocyte lineage was also detected on 32D cl3, being more evident for the caseins than for CasNa (Table 3A).

Table 3. Cell differentiation of 32D cl3 and WEHI-3 cell line treated with casein

	Cytochemistry (%)		FACS	
	Granulocytes	Monocytes	(Gr-1)	(M-CSFR)
(A)				
Without inducer	51 \pm 10.5	4 \pm 1.9	1	1
CasNa (1 mg/mL)	26 \pm 11.4	26 \pm 4.1*	1.34	2.63
α (1 mg/mL)	34 \pm 12.4	26 \pm 11.7*	1.61	2.12
β (1 mg/mL)	40 \pm 11.2	23 \pm 8.7*	1.85	2.09
κ (1 mg/mL)	42 \pm 9.8	13 \pm 3.6*	1.5	1.31
(B)				
Without inducer	73 \pm 10.1	3 \pm 1.0	1	1
CasNa (1 mg/mL)	72 \pm 11	2 \pm 3.1	1.2	1.21
α (1 mg/mL)	66 \pm 7.2	3 \pm 1.2	1.34	1.47
β (1 mg/mL)	71 \pm 10.3	4 \pm 1.0	1.21	1.48
κ (1 mg/mL)	72 \pm 8.1	3 \pm 3.0	1.23	1.45

Percentage of granulocytes and macrophages obtained from 32D cl3 (A) and WEHI-3 (B) cell lines treated with sodium caseinate (CasNa), α -casein (α), β -casein (β) or κ -casein (κ) after 3 days of incubation and staining with alpha naphthyl acetate esterase, specific for macrophages, and chloroacetate esterase, specific for granulocytes. Results expressed as a mean \pm SD from cultures without casein. The antibody anti-Gr-1, specific for granulocytes, and antibody anti-M-CSFR (c-fms), specific for macrophages, was detected by FACS and the result was expressed as the fold increase in fluorescence (treatment fluorescence/control fluorescence). *Results are significantly different ($P < 0.05$) from that of the control (0 mg/mL), as determined by Student's *t*-test.

In order to evaluate if other differentiation properties were also induced by CasNa we measured the induction of FcR through a rosette assay: We found a significantly large induction of rosettes obtaining that $46 \pm 6.9\%$ of 32D cl3 cells formed rosettes when treated with 1 mg/mL of CasNa versus $10 \pm 1.5\%$ in untreated cells. When 10 ng/mL of rmIFN- γ was used as a control for FcR induction, $44 \pm 4.1\%$ of the cells formed rosettes.

CasNa and the caseins induce the expression of mRNA for M-CSF and M-CSFR in 32D cl3 cells and not in WEHI-3 cells, while only CasNa and the α -casein could induce the secretion of M-CSF in these cells

Once we determined that the caseins were able to induce protein expression of the receptor for M-CSF on 32D cl3 cells, we next evaluated if mRNA expression for M-CSF and M-CSFR was also induced in these cells, as well as in WEHI-3.

Using the same cell culture conditions as those for the differentiation assays, we determined that CasNa and all the caseins were able to induce mRNA expression for M-CSF and its receptor on 32D cl3 cells, but not in WEHI-3 cells (Figs. 3, 4A and B).

In order to evaluate if the caseins could induce M-CSF production in the cell lines, we measured by an ELISA assay the presence of M-CSF in the culture media. Interestingly, and once again pointing to the different inducing capabilities for the different caseins, we determined that only 32D cl3 cells were induced to release M-CSF by CasNa and the α -casein, with CasNa being the best inducer with 1.3 ng/mL, while the α -casein was somewhat lower with 0.3 ng/mL (Fig. 5).

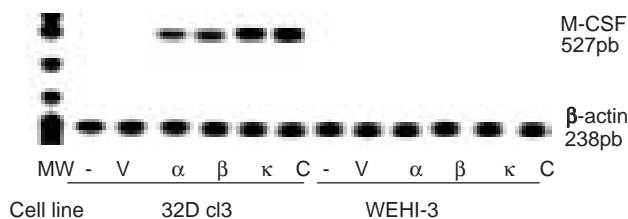


Fig. 3. Casein induces M-CSF mRNA expression in 32D cl3 cells but not in WEHI-3 cells. Both cell lines were cultured for 72 h with or without 1 mg/mL of different casein. Total RNA was extracted and RT-PCR was performed. The specificity of the cDNA was verified by the presence of products of the expected size on an agarose gel. MW, molecular weigh marker; – without inducer; V, vehicle; α , α -casein; β , β -casein; κ , κ -casein; C, sodium caseinate. β -Actin was used as a cellular control. The figure is a representative example of three different assays.

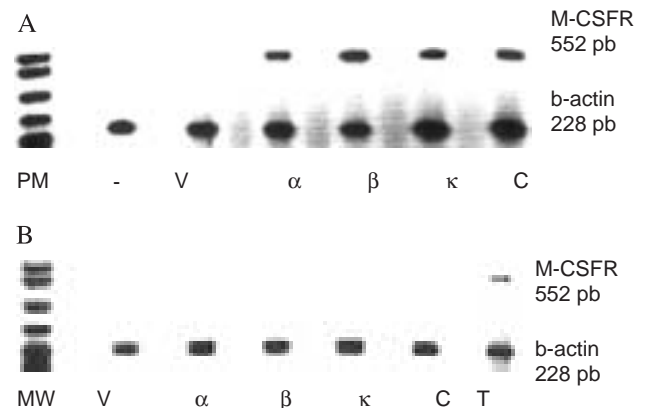


Fig. 4. Casein induces M-CSF receptor (M-CSFR) mRNA expression in 32D cl3 cells (A) but not in WEHI-3 cells (B). Both cell lines were cultured for 72 h with or without 1 mg/mL of different caseins. Total RNA was extracted and RT-PCR was performed. The specificity of the cDNA was verified by the presence of products of the expected size on an agarose gel. MW, molecular weigh marker; – without inducer; V, vehicle; α , α -casein; β , β -casein; κ , κ -casein; C, sodium caseinate. β -Actin was used as a cellular control. T, an additional assay from 32D cl3 cells treated with C was used as a control for M-CSFR RNA expression in WEHI-3 cells. The figure is a representative of three different assays.

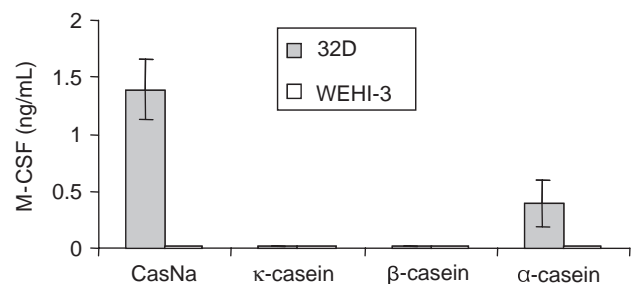


Fig. 5. CasNa and α -casein induce secretion of M-CSF in 32D cl3 cells. The conditioned media (CM) from 32D cl3 cells was collected after 48 h in culture in the presence of rmIL-3 (0.5 ng/mL) with 1 mg/mL of CasNa, α -, β - or κ -casein. The concentration (ng/mL) of M-CSF in CM was detected by ELISA assay.

The M-CSF secreted by 32D cl3 cells after induction by CasNa is bioactive and its specific antibody does not block the induction of its receptor on these cells

It is well known that M-CSF is a potent cell differentiator of myeloid cells towards the monocyte-macrophage lineage and that one of its important regulatory factors is the induction of other differentiation inducers and of their receptors, even the up-regulation of its own receptor (Gliniak and Rohrschneider, 1990). In order to evaluate if the M-CSF secreted by 32D cl3

cells through the induction of CasNa is bioactive, we used the conditioned media of 32D cl3 cells in a bone marrow colony forming assay. Our results showed that the M-CSF secreted by 32D cl3 cells under the induction of CasNa is bioactive, forming a similar number of colonies as those obtained with rmM-CSF, and that both were also completely inhibited by the use of anti-M-CSF (Fig. 6).

On the other hand, in order to evaluate if the presence of anti-M-CSF in these cultures could down-regulate the expression of the M-CSFR, we added anti-M-CSF to the culture media and evaluated the expression of the receptor for M-CSF in these cells. We determined that

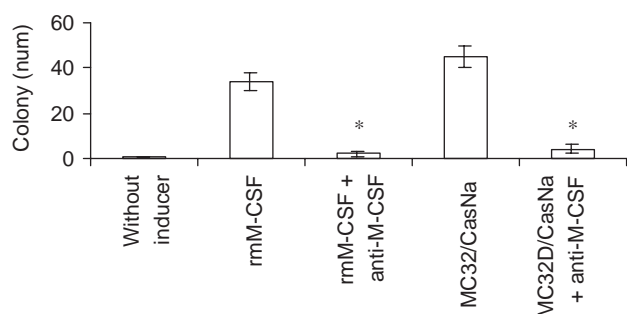


Fig. 6. The number of bone marrow colonies induced by CM of 32D cl3 cells cultured for 48 h with 0.5 ng/mL of rmIL-3 in presence of 2 mg/mL CasNa with or without anti-M-CSF (1:200 dilution). The number of colonies induced with 20 ng/mL of M-CSF in presence or absence of anti-M-CSF was evaluated as positive control. Agar cultures were kept for 7 days. The data are represented as the mean \pm SD of three independent experiments and differences (*) were significant at $p < 0.05$, as determined by Student's *t*-test.

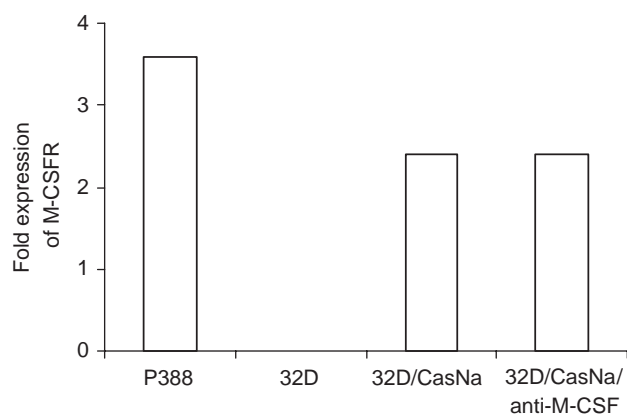


Fig. 7. Fold increase (treatment fluorescence/control fluorescence) over saline control of expression of M-CSFR antigen in 32D cl3 cells cultured for 72 h with CasNa in presence or absence of anti-M-CSF antibody. Expression of M-CSFR in the mouse macrophage cell line P388 was used as a positive control. 32D cl3, 32D cl3 cells without CasNa; 32D cl3/CasNa, 32D cl3 cells with CasNa; 32D cl3/CasNa/anti M-CSF, 32D cl3 cells with CasNa plus anti-M-CSF antibody.

the presence of anti-M-CSF in the cultures did not down-regulate the expression of M-CSFR (Fig. 7).

Discussion

The mechanisms by which hematopoietic growth factors regulate blood cell proliferation and differentiation has been studied in detail and several interleukins and different types of endogenous cytokines have been described (Socolovsky et al., 1998; Kaushansky, 2006). Nevertheless, little is known of the existence of exogenous molecules that might have this effect. In this work we present evidence that milk caseins have the capacity to inhibit myeloid cell proliferation and to induce cell differentiation.

We determined that the α -, β - and κ -caseins have different potentials to regulate the proliferation and differentiation of two myeloid cell lines. The inhibition of cell proliferation and differentiation into the monocyte-macrophage lineage was obtained in 32D cl3 cells, while only cell inhibition and not differentiation was induced in WEHI-3 cells in a non-toxic way. It is interesting to note that CasNa, a salt of casein that contains all three caseins in its structure, was more effective in the inhibition of 32D cl3 cell proliferation but less effective in WEHI-3 cells; in fact, the κ -casein was in this case far more potent than the other caseins. These results point to the fact that the different caseins might have different hematopoietic properties.

It would be interesting to evaluate the inhibitory and differentiation properties of caseins in other myeloid cells in order to determine if this effect is characteristic of these cell types and to evaluate if the differentiation into macrophages can only be obtained in normal cells like 32D cl3 and not on leukemic cells like WEHI-3. Nevertheless, these data indicate that α -, β - and κ -caseins have myelopoietic properties, and the finding that these caseins could inhibit leukemic cell proliferation opens an interesting field of research to evaluate their possible therapeutic use.

It is interesting to note that even though all caseins were able to induce the expression of M-CSF in 32D cl3 cells, only the α -casein was able to induce its secretion. This result once again points to the different hematopoietic regulatory functions that the different caseins might have.

The caseins are known to contain in their structure potent bioactive peptides, some with opioid properties (Otani and Hata, 1995; Meisel, 2005). It would be thus interesting to evaluate if there are peptides in these molecules that might exhibit the different differentiation properties obtained in this work. Nevertheless, it is also interesting to note that receptors for complete casein molecules or CasNa have also been detected on myeloid and other cell types (Lewis and Van Epps, 1983; Hira

et al., 2003). Complete casein molecules, or bioactive peptides contained within their structure could have interesting blood cell regulatory properties that could open the way for a new field of basic and clinical research for this type of molecule.

Taking into consideration that the caseins induced in 32D cl3 cells the expression of mRNAs for M-CSF and for its membrane receptor, as well as other differentiation properties measured by specific cytochemical stains, and that CasNa also induced the secretion of bioactive M-CSF, we also evaluated the possibility that M-CSF was, in fact, the growth factor responsible for these differentiation properties. We determined that the induction took place even in the presence of anti-M-CSF, thus hinting at a different mechanism for macrophage induction of these cells. Published reports have demonstrated differentiation mechanisms unrelated to M-CSF for 32D cl3 cells towards macrophages due to the overexpression of inhibitory proteins of the CDK4 and CDK6 cycle (Adachi et al., 1997) or the activation of protein kinase C (Kovanen et al., 2000). Thus, it would be interesting to evaluate the possible role of the caseins in these types of regulatory mechanisms.

It has been published that caseins like κ -casein can inhibit lymphoid cell proliferation (Otani et al., 1992; Otani and Hata, 1995), while β -casein, on the contrary, can induce its proliferation (Wong et al., 1996; Monetini et al., 2003). These results and the ones presented in this work point to the multiple potential roles that caseins might have in hematopoiesis.

In conclusion α -, β - and κ -caseins, the components of casein, the main protein in milk, inhibit the proliferation of the normal and leukemic myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 in a dose- dependent way and present different differentiation properties. The 32D cl3 cells were induced to express mRNAs for M-CSF and M-CSFR, while CasNa and α -casein also induced the secretion of M-CSF, the specific growth factor for the monocyte-macrophage lineage.

Acknowledgments

We thank Mr. Ranulfo Pedraza Garnelo† for excellent technical assistance. This work was supported in part by PAPIIT (IN214903, IN217407) of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

References

- Adachi, M., Roussel, M., Haveith, K., Sherr, C., 1997. Features of macrophage differentiation induced by p19INK4d, a specific inhibitor of cyclin D-dependent kinases. *Blood* 90, 126–137.
- Anderson, S.J., Furth, M.E., Wolff, L., Ruscetti, S.K., Sherr, C.J., 1982. Preparation of rat monoclonal antibodies to epitopes encoded by the viral oncogene (v-fms) of McDonough feline sarcoma virus. *J. Cell. Biochem.* 19, 275–280.
- Bianco, C., Patrick, R., Nussenzweig, V., 1970. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complements complexes. I. Separation and characterization. *J. Exp. Med.* 132, 702–720.
- Gliniak, B.C., Rohrschneider, L.R., 1990. Expression of the M-CSF receptor is controlled posttranscriptionally by the dominant actions of GM-CSF or multi-CSF. *Cell* 63, 1073–1083.
- Greenberger, J.S., Sakakeeny, M.A., Humphries, R.K., Eaves, C.J., Eckner, R.J., 1983. Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2931–2935.
- Hestdal, K., Ruscetti, F.W., Ihle, J.N., Jacobsen, S.E., Dubois, C.M., Kopp, W.C., Longo, D.L., Keller, J.R., 1991. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J. Immunol.* 147, 22–28.
- Hira, T., Hara, H., Tomita, F., Aoyama, Y., 2003. Casein binds to the cell membrane and induces intracellular calcium signals in the enteroendocrine cell: a brief communication. *Exp. Biol. Med.* 228, 850–854.
- Kaushansky, K., 2006. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.* 354, 2034–2045.
- Kovanen, P., Junttila, I., Takaluoma, K., Saharin, P., Valmu, L., Li, W., Silvenoinen, O., 2000. Regulation of Jak2 tyrosine kinase by protein kinase C during macrophage differentiation of IL-3-dependent myeloid progenitor cells. *Blood* 95, 1626–1632.
- Lewis, S., Van Epps, E.D., 1983. Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation* 7, 363–375.
- Li, C.Y., Lam, K.W., Yam, L.T., 1973. Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 21, 1–12.
- Lorient, D., Alais, C., 1970. Heat degradation of bovine α - and β -casein. I. Factors in variation of the degradation. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52, 915–926.
- Lotem, J., Sachs, L., 1983. Control of in vivo differentiation of myeloid leukemic cells. III, regulation by T lymphocytes and inflammation. *Int. J. Cancer* 32, 781–791.
- Lotem, J., 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, 93–100.
- Meisel, H., 2005. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk protein. *Curr. Med. Chem.* 12, 1905–1919.
- Metcalf, D., Robb, L., Dunn, A., Mifsud, S., Rago, L., 1996. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood* 88, 3755–3764.
- Monetini, L., Barone, F., Stefanini, L., Petrone, A., Walk, T., Jung, G., Thorpe, R., Pozzilli, P., Cavallo, M., 2003.

- Establishment of T cell lines to bovine beta-casein and beta-casein-derived epitopes in patients with type 1 diabetes. *J. Endocrinol.* 176, 143–150.
- Otani, H., Hata, I., 1995. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. *J. Dairy Res.* 2, 339–348.
- Otani, H., Monnai, M., Hosono, A., 1992. Bovine κ -casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft* 47, 512–515.
- Pluznik, D.H., Sachs, L., 1966. The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium. *Exp. Cell Res.* 43, 553–563.
- Ramos, G., Santiago, E., Martínez, I., Zambrano, I., Manrique, B., Weiss, B., 2000. El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev. Invest. Clin.* 52, 638–644.
- Ramos, G., Weiss, B., Córdova, Y., Hernández, J., Zambrano, I., Santiago, E., 2004. Sodium caseinate induces the murine multipotent myeloid cell line 32D to express and secrete the macrophage colony stimulating factor (M-CSF). *Arch. Med. Res.* 35, 109–113.
- Raivich, G., Haas, S., Werner, A., Klein, M.A., Kloss, C., Kreutzberg, G.W., 1998. Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *J. Comp. Neurol.* 395, 342–358.
- Sachs, L., 1990. The proteins that control haemopoiesis and leukaemia. *Ciba Found. Symp.* 148, 5–19 discussion 19–24.
- Socolovsky, M., Constantinescu, S.N., Bergelson, S., Sirotkin, A., Lodish, H.F., 1998. Cytokines in hematopoiesis: specific and redundancy in receptor function. *Adv. Protein Chem.* 52, 141–198.
- Swartz, M., Walker, N., Creamer, L., Southward, R., 1992. Casein and caseinates. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Encyclopedia of Food Science and Technology*, vol. 1. Wiley-Interscience Publication, USA, pp. 310–317.
- Wong, C.W., Seow, H.H.S., Liu, A.H., Husband, A.J., Smithers, G.W., Watson, D.L., 1996. Modulation of immune responses by bovine β -casein. *Immunol. Cell Biol.* 74, 323–329.