



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer
Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia

“Efecto del caseinato de sodio, tioglicolato de sodio e hidrolizado de caseína, en la proliferación y diferenciación de células mononucleadas de médula ósea”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

BEATRIZ MARTÍNEZ DE LA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MEXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

María Rosa de la Cruz Cruz

A mi Mamá quien siempre trato de comprenderme en los momentos más difíciles, quien más que una madre, fue una amiga cuando más lo necesite, quien escucha todas mis loqueras jejeje, gracias por estar siempre conmigo, por todas las noches que pasó en vela acompañándome mientras yo terminaba un trabajo o estudiaba para un examen, por preocuparse por mí en todos los aspectos y gracias por todos esas palabras que me ayudaron a seguir adelante.

Olegario Martínez de la Cruz

A mi Papá quien siempre me aconsejó y me encamino para conseguir mi meta, gracias por todo su apoyo, pero le agradezco más por los regaños que me hizo cuando yo me equivoque porque crea o no, todos sus consejos y regaños me sirvieron mucho para poder lograr mis objetivos, a veces creo que no le expreso lo muy agradecida que estoy con usted, pero en verdad lo estoy y lo más importante lo quiero demasiado gracias por ser mi padre.

Muchas gracias por todo, saben que nunca existirá una forma de agradecerles una vida de lucha, sacrificios y esfuerzos constantes, sólo deseo que entiendan que el logro mío, es el logro suyo, que mi esfuerzo es inspirado en ustedes y que mi único ideal son ustedes, son las personas que más admiro y quiero en el mundo GRACIAS POR SER MIS PADRES, LOS AMO.

A mis hermanos:

Carlos Daniel Martínez de la Cruz

Por soportar todo este tiempo mis arranques bipolares, por alegrar cada uno de mis días, por escuchar mis traumas y por ese interés que siempre muestras hacia mí en todo lo que yo hago, te quiero muxo chatito eres una personita super importante en mí vida, siempre estaremos juntos, sabes que cuentas conmigo y que nunca te dejare sólo. Te amo y gracias por llegar a mi vida.

Adriana Martínez de la Cruz y a su beba Erandi Sarai

Por estar siempre conmigo en los momentos más difíciles y tratar de escucharme cuándo quiero platicar con alguien, sé que no soy la hermana perfecta, pero sabes que siempre podrás contar conmigo, te quiero muxo y estoy muy orgullosa de ti, que a pesar de todo estas saliendo adelante, se que lo lograras te quiero muxo y gracias por ser mi hermanita jejejeje.

A mi yomi yomi jejeje por hacerme enojar todos los días jajajajaja, no es cierto gracias por que le das un toque adicional de alegría a mi vida, te quiero muxo sobrinita eres lo máximo.

Agradecimientos

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por la dirección de este trabajo de tesis, por el apoyo incondicional, confianza, y sobre todo la gran paciencia que me brindó durante la estancia en el laboratorio a pesar de muchas inconsistencias de mi parte, le agradezco de todo corazón.

Al M. en C. Oswaldo Silvestre Santana quien me formó dentro del laboratorio, respondiendo todas mis dudas, por su gran paciencia, y por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Vaniamin Domínguez, por su paciencia, cooperación y su ayuda para la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado.

Dr. Benny Weiss Steider

Dra. Patricia Rosas Sucedo

Dra. Ma. De Lourdes Mora García

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Por las sugerencias recibidas que ayudaron a enriquecer éste trabajo.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia (L-8) de la FES-Zaragoza, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria Experimental Zaragoza y contó con el apoyo de PAPIIT, UNAM (IN21707).

Agradecimientos

Al M. en C. Oswaldo Silvestre Santana, no tengo palabras para agradecerte todo el apoyo incondicional, por todos tus consejos que me ayudaron cuando más lo necesitaba, por estar siempre al pendiente del proceso para la elaboración de mi tesis, a pesar de que no era tu responsabilidad siempre estuviste ayudándome y orientándome, en verdad no sabes lo agradecida que esta mi familia y sobre todo yo por todo tu empeño y dedicación que me brindaste para poder lograr este objetivo en mi vida, gracias por ser mi maestro, mi compañero y sobre todo mi amigo te estimo mucho Osw y no tengo las palabras correctas para agradecer todo lo que hiciste por mí, tanto en el laboratorio como en lo personal. GRACIAS.

Al candidato a Dr. en C. Vaniamin Domínguez y a la Biol. Norma Angélica Sosa Hernández quienes también participaron en mi formación dentro del laboratorio, por ofrecerme su amistad, su ayuda, por todos sus consejos y por el apoyo brindado durante el desarrollo de la presente tesis, muchas gracias.

A mis amigas del laboratorio a Miry y Clau, gracias chicas por alegrar mi días con todas esas incoherencias que decíamos, por escuchar mis problemas existenciales y por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, gracias.

A mis compañeros del laboratorio, Rey, Jessy, Chio, Edagar, Yola, Itzen, Axel, Peter, Damian, Lupita, Angeles, que a pesar de que con algunos conviví poco tiempo, hicieron tan divertida mi estancia en el laboratorio y gracias por sus atenciones conmigo.

A Miguel Ángel Alvarado Dávila

Por formar parte de mi vida, por apoyarme y siempre animarme para seguir adelante, por alegrar mis días, por enseñarme a disfrutar cada uno de mis días a tu lado, a quien admiro por su valentía, entereza y fuerzas para luchar y seguir adelante, por inculcarme que en tiempos

de tempestad, hay que ser fuertes y sacar lo mejor de nosotros, te quiero mucho MAAD sabes que eres especial en mi vida, GRACIAS por todo.

A la Biol. Kary Pérez, mi amigis, por apoyarme cuando menos lo esperaba, por sus consejos, quien siempre estuvo conmigo en los momentos buenos y difíciles, te estimo muxo chiquis y te admiro, no tengo palabras para agradecer que me hayas brindado tu amistad.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Introducción.....	5
Hematopoyesis.....	5
Ontogenia hematopoyética.....	8
Microambiente hematopoyético.....	10
Citocinas.....	12
Inflamación.....	14
Caseínas en la hematopoyesis e inflamación.....	20
Planteamiento del problema.....	22
Justificación.....	23
Hipótesis.....	24
Objetivos.....	25
Material y Método.....	26
Resultados.....	31
Discusión de resultados	51
Conclusiones.....	54
Referencias bibliográficas.....	55
Apéndice.....	68

RESUMEN

La hematopoyesis es regulada por citocinas, sin embargo se han encontrado moléculas diferentes a las citocinas que pueden modular este proceso, tal es el caso del ácido all-transretinoico (ATRA) y el caseinato de sodio (CasNa), una sal derivada de la caseína. Se sabe que el CasNa, el tioglicolato de sodio (TioNa) y el hidrolizado de caseína (HC) son agentes proinflamatorios, ya que su inyección en ratón induce migración de granulocitos a cavidad peritoneal. Por otro lado nuestro grupo de trabajo ha mostrado que el CasNa, tanto *in vitro* como *in vivo*, activa la hematopoyesis incrementando la proliferación y diferenciación de células mononucleadas (CMN), sin embargo se desconoce si otros agentes proinflamatorios como el TioNa e HC activan la hematopoyesis, *in vitro* e *in vivo*, tal como lo hace el CasNa.

En éste trabajo evaluamos el efecto del CasNa, TioNa e HC *in vitro* e *in vivo* sobre la activación de la hematopoyesis de ratón. Los primeros datos obtenidos confirman que la inyección vía intraperitoneal, a diferentes concentraciones, de cada una de las 3 moléculas induce migración de granulocitos a cavidad peritoneal, aunque el CasNa mostró el mayor aumento en el número de estas células. Después se evaluó si estas moléculas activan la hematopoyesis *in vitro*. Para ello se cultivaron CMN de médula ósea tratadas con diferentes concentraciones de CasNa, TioNa e HC. Los resultados indican que el CasNa fue la única molécula que aumentó significativamente la proliferación celular, mientras que el TioNa e HC la inhibieron. Al evaluar la morfología de estas células se observaron granulocitos y macrófagos independientemente del tratamiento, sin embargo el CasNa presentó un incremento en el número de agregados de estos dos tipos celulares. Para confirmar estos resultados, mediante citometría de flujo se evaluó la expresión de marcadores específicos para granulocitos y macrófagos como Gr-1 y CD11b respectivamente, donde sólo las CMN tratadas con CasNa presentaron un mayor número de células positivas para ambos marcadores. Finalmente se determinó si el efecto *in vitro* de las moléculas empleadas se conservaba *in vivo*. Para ello ratones BALB/c fueron inyectados vía intraperitoneal cada

48 horas durante 6 días a diferentes concentraciones con CasNa, TioNa e HC, evaluando después la proliferación de células de médula ósea mostrada por el incremento del índice mitótico. Los resultados obtenidos revelan que el CasNa, presenta la mayor proliferación. Con el conjunto de datos reportados en este trabajo se concluye que el CasNa es el único agente proinflamatorio capaz de regular positivamente la hematopoyesis normal de ratón, tanto *in vivo* como *in vitro*, en comparación con agentes proinflamatorios como el TioNa e HC.

INTRODUCCIÓN

Hematopoyesis

Dentro de nuestro organismo existen diversas células sanguíneas, las cuales cumplen con diferentes funciones; los eritrocitos transportan oxígeno a los tejidos, las plaquetas ayudan en el proceso de coagulación de la sangre, mientras que los leucocitos (granulocitos, macrófagos y linfocitos) participan en la defensa inmune contra una infinidad de agentes patógenos¹, que pueden conducir a la muerte celular, así se tiene que alrededor de 2×10^{11} eritrocitos y 10^{10} leucocitos mueren diariamente al desarrollar su función, por lo tanto deben ser reemplazados para mantener el equilibrio normal de células sanguíneas^{2,3,4,5}. A la generación de células de la sangre se conoce como hematopoyesis⁶.

Las células sanguíneas se forman a partir de células troncales hematopoyéticas (CTHs), que corresponden al 0.001% del total de las células presentes en la médula ósea^{5,7}, en su mayoría se encuentran en quiescencia (fase G_0 del ciclo celular), y solo se dividen para mantener el estado normal de la hematopoyesis o dependiendo de la demanda de progenitores en el organismo, lo cual asegura que la población de CTHs no se pierda bajo condiciones de estrés fisiológico y puedan mantenerse a lo largo de toda la vida⁸. Las CTHs son de origen mesodérmico, se caracterizan por su capacidad de autorenovación, un alto potencial de proliferación y una capacidad para diferenciarse hacia todos los linajes de células sanguíneas, estas características se van perdiendo conforme las células hematopoyéticas se diferencian en elementos más maduros, características que permiten ubicarlas, de manera jerárquica, al principio de la cascada hematopoyética^{9,10}.

Se ha reportado que en ensayos de reconstitución hematopoyética, las CTHs se pueden clasificar en: células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo (CTH-LP), las cuales tienen la capacidad de sostener la hematopoyesis indefinidamente,

éstas se mantienen principalmente en quiescencia, y por las células troncales hematopoyéticas reconstituyentes a corto plazo (CTH-CP), las cuales tienen la capacidad de reconstituir la hematopoyesis solo por un corto tiempo y se encuentran ciclando constantemente¹¹.

Las CTHs no pueden ser identificadas a simple vista por su morfología, para ello se requieren marcadores específicos tales como: lin⁻ (un coctel de marcadores para células hematopoyéticas maduras que las CTHs no deben expresar), Sca-1⁺ y c-Kit⁺, con lo cual se define el inmunofenotipo Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺ (LSK)^{4,7,12,13,14}.

Las CTHs dan origen a las células progenitoras, las cuales constituyen alrededor del 0.5% de células totales de la médula ósea, estas pueden ser multipotentes, bipotentes o monopotentes. Las células progenitoras a su vez darán origen a las células precursoras que pueden ser fácilmente reconocidas por su morfología y constituyen más del 90% de las células totales que residen en la médula ósea. Finalmente de las células precursoras se originarán las células maduras, éstas a su vez pueden dividirse en dos linajes: el linaje mielóide, compuesto por eritrocitos, megacariocitos, granulocitos y macrófagos; y el linaje linfóide, integrado por los linfocitos T, B y células naturales asesinas (NK), de ambos linajes pueden originarse las células dendríticas^{5,15}. De esta manera la jerarquización de las células hematopoyéticas es representada en la **figura 1**.

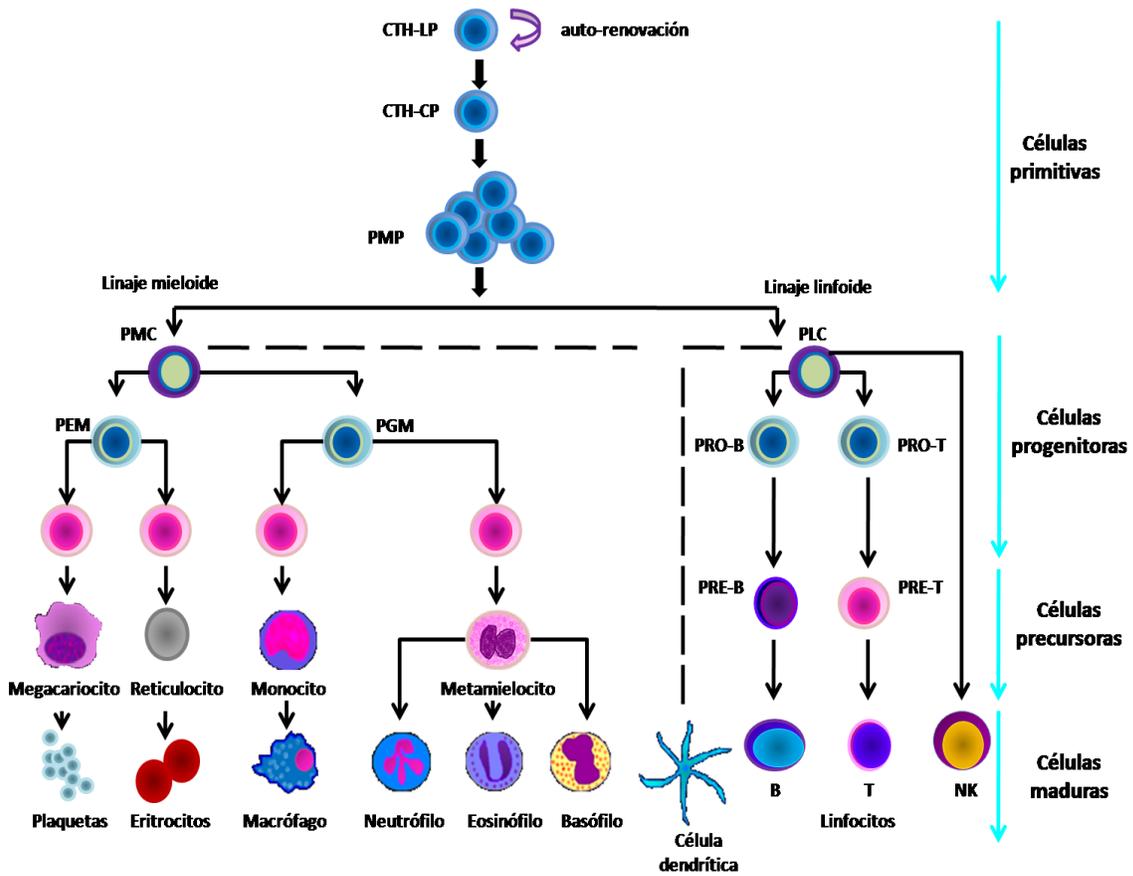


Figura 1. Jerarquía de las células hematopoyéticas. Las células hematopoyéticas pueden ser agrupadas en cuatro compartimentos de acuerdo a su grado de diferenciación: 1) Compartimento de células primitivas : célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo (CTH-LP) célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo (CTH-CP) y célula progenitora multipotente (PMP); 2) compartimento de células progenitoras: progenitor mieloide común (PMc), progenitor linfoide común (PLC), progenitor eritroide-megacariocítico (PEM), progenitor granulocito-macrófago (PGM), progenitor de linfocitos B (PRO-B) y el progenitor de linfocitos T (PRO-T); 3) compartimento de células precursoras y 4) células maduras (modificado de^{5, 7,15,16, 17,18}).

Ontogenia hematopoyética

Las primeras CTHs se originan en el saco vitelino, en estructuras llamadas islotes sanguíneos a este evento se le conoce como hematopoyesis primitiva, y puede ser detectable alrededor del día 7.5 p.c. en ratón. Aunque el saco vitelino es el primer sitio donde se originan las primeras CTHs con potencial para generar todos los linajes hematopoyéticos, solo se lleva a cabo la eritropoyesis, por lo que se considera que las CTHs migran hacia otros órganos con actividad hematopoyética como: la aorta gónada mesonefros (AGM) alrededor del día 10.5-11.5, donde a partir de este momento las CTHs pueden diferenciarse hacia todos los linajes de células sanguíneas, estableciéndose así la hematopoyesis definitiva^{19,20,21,22,23}. Sin embargo existe otra teoría donde se menciona, que sólo en la AGM surgen las primeras CTHs con capacidad de generar toda la gama de células hematopoyéticas^{24,25}. Posteriormente las CTHs migran hacia otros órganos hematopoyéticos como el hígado y bazo alrededor del día 12.5-13.5, sosteniendo la hematopoyesis durante la primera mitad de gestación. Finalmente a partir del día 15 del desarrollo embrionario y después del nacimiento, la hematopoyesis se lleva a cabo en la médula ósea de todo los huesos^{10,26,27} (**figura 2**). En la etapa adulta y durante toda la vida del individuo la hematopoyesis se restringe sólo a huesos planos y largos del cuerpo como el cráneo, costillas, fémur, vertebras, esternón y la cresta iliaca²⁸.

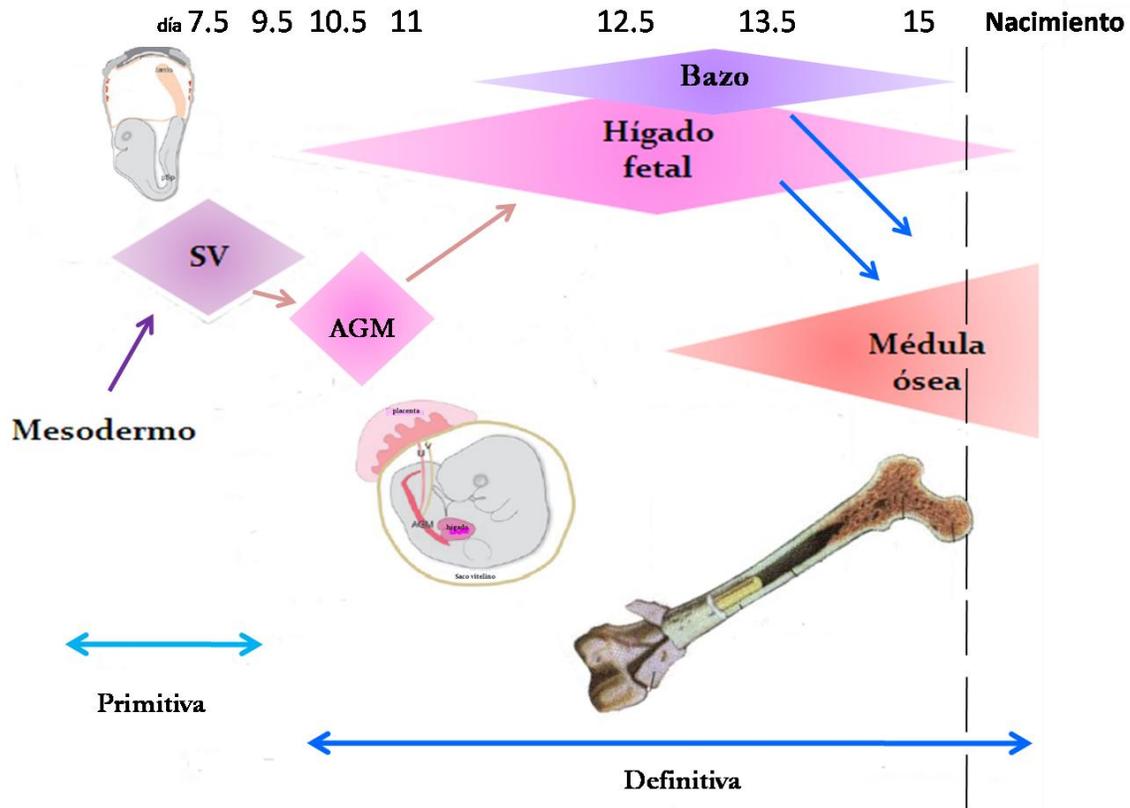


Figura 2. Ontogenia hematopoyética. La hematopoyesis primitiva comienza en la etapa embrionaria en el saco vitelino (SV) alrededor de 7.5 días, el siguiente sitio hematopoyético donde se establece la hematopoyesis es la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) a partir del día 10.5-11.5, posteriormente las CTHs migran a hígado y bazo (día 12.5-13.5) y por último a la médula ósea, donde a partir del nacimiento sostendrá la hematopoyesis durante el resto de vida del individuo (modificado de^{10,22}).

Microambiente hematopoyético

La hematopoyesis es un proceso finamente regulado que requiere de ciertas condiciones particulares las cuales pueden ser proporcionadas por un ambiente específico llamado microambiente hematopoyético (MH). El MH tiene una estructura tridimensional altamente organizada y su función principal consiste en regular la fisiología y localización de las células hematopoyéticas, así como proveer las condiciones necesarias para que se lleve a cabo la hematopoyesis⁵ (**figura 3**).

El MH de médula ósea está formado por dos componentes: el componente celular y el componente protéico. El componente celular está integrado por células tronco mesenquimales las cuales darán origen a células estromales tales como: fibroblastos, adipocitos, osteoblastos, condrocitos. El componente protéico está conformado por productos de las células estromales como las citocinas y moléculas de la matriz extracelular, tal es el caso del colágeno I-VI, fibronectina, laminina, tenascina, proteoglicanos y citocinas^{5,7,11}.

Dentro de la médula ósea existen sitios específicos donde residen las CTHs, los llamados nichos. Existen dos tipos diferentes de nichos, el primero es conocido como nicho osteoblástico, constituido por osteoblastos y está ubicado en la zona endosteal de la cavidad ósea donde las CTHs se encuentran ancladas a los osteoblastos por moléculas de adhesión, la función de este nicho es mantener a las CTHs en estado quiescente. Las CTHs al recibir un estímulo o estrés fisiológico proliferan y se diferencian según los requerimientos del organismo, y antes de ser liberadas a la circulación migran a un segundo sitio conocido como nicho vascular, conformado por células endoteliales sinusoidales que tienen un papel importante en la regulación y migración de células hematopoyéticas. En conjunto ambos nichos cooperan para controlar la quiescencia y la autorenovación, así como la producción de progenitores hematopoyéticos para mantener

la homeostasis o restablecer el sistema después de un daño^{11,14,29}.

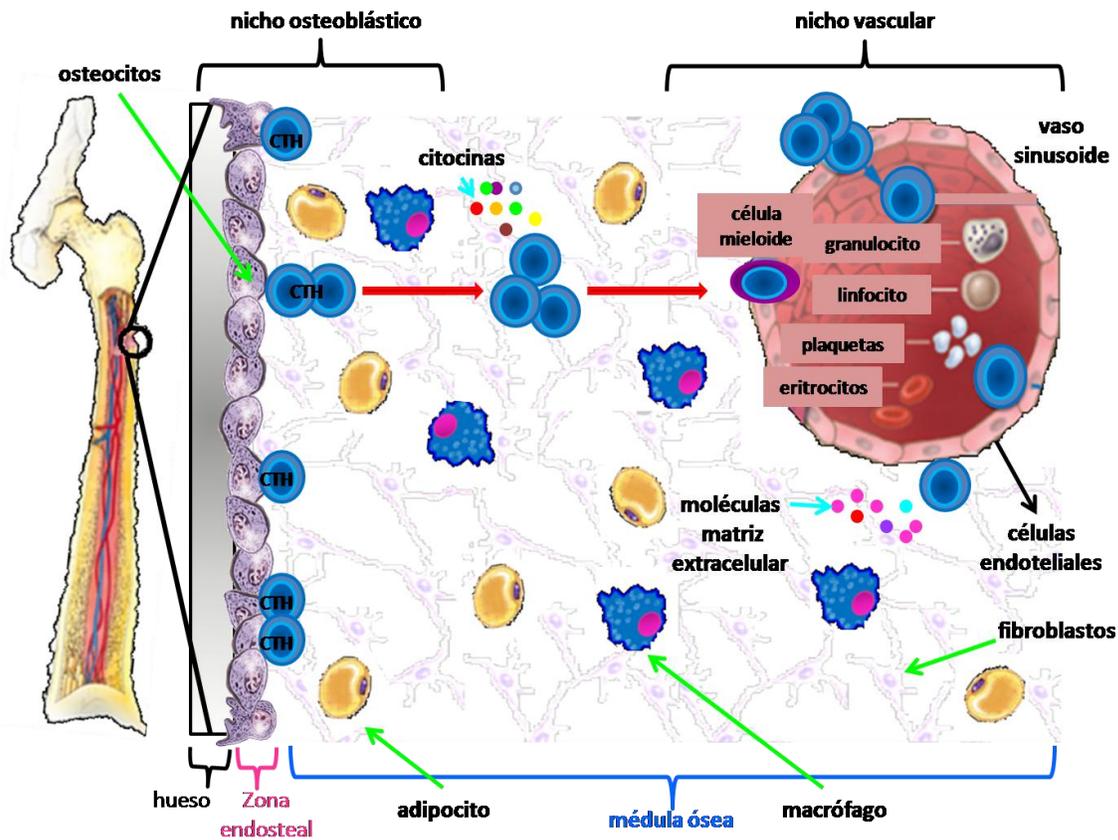


Figura 3. Esquema representativo del microambiente hematopoyético (MH) en médula ósea. En el MH se localizan las células estromales (fibroblastos, adipocitos, osteoblastos y células endoteliales), así como sus productos (moléculas de la matriz extracelular y citocinas), estos elementos en conjunto modulan la proliferación, maduración, muerte y migración de las células hematopoyéticas. Dentro del MH también se encuentran dos nichos de CTHs: el nicho osteoblástico donde las CTHs se mantienen ancladas a la zona endosteal y se encuentran en estado quiescente, y el nicho vascular donde las CTHs se encuentran ciclando, listas para diferenciarse y salir a torrente sanguíneo (modificado de^{5,11}).

Citocinas

Las citocinas son glicoproteínas, de bajo peso molecular (30 KDa), producidas tanto por células estromales como células hematopoyéticas, éstas incluyen interleucinas (ILs), factores estimuladores de colonias (CSFs), interferones, factores de crecimiento y quimiocinas. Las citocinas pueden regular la supervivencia, proliferación, diferenciación, maduración, activación y muerte de las células hematopoyéticas^{7,30}.

Las citocinas pueden ejercer múltiples efectos biológicos sobre diferentes tipos celulares (pleiotropismo) o pueden actuar de manera específica, como por ejemplo del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) que interviene directamente en la diferenciación de macrófagos; o pueden presentar un efecto sinérgico, es decir, la habilidad de interactuar con otras citocinas potenciando su efecto. Las citocinas no solo regulan de manera positiva la hematopoyesis ya que se ha observado que algunas de éstas tiene efecto negativo como sucede con el factor de necrosis tumoral (TNF), el cual provoca la inhibición de la proliferación de células hematopoyéticas, también está el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1), que inhibe la actividad y la producción de algunos CSFs e ILs^{31,32}.

El efecto de las citocinas sobre las células hematopoyéticas es mediado por receptores que se encuentran en la superficie de la membrana celular. Estos receptores presentan un dominio extracelular, un transmembranal y un dominio intracelular, este último recluta diferentes moléculas para su fosforilación la cual finalmente activara una transducción de señales mediado por una familia de tirosinas cinasas llamadas Janus Cinasas (JAKs) y los factores de transcripción conocidos como traductores de señales y activadores de transcripción (STATs)^{33,34,35}, que en conjunto dan como resultado la modulación de la expresión de genes que estimulan biológicamente una serie de respuestas biológicas.

Diferentes citocinas pueden producir un mismo efecto sobre una misma célula, esto es debido a que los receptores de citocinas comparten ciertas sub-ubidades estructurales. De esta manera los receptores pueden ser clasificados en: receptores de la cadena- β , receptores gp130, receptores de la cadena- γ y receptores de una cadena simple ^{6,36} (figura 4).

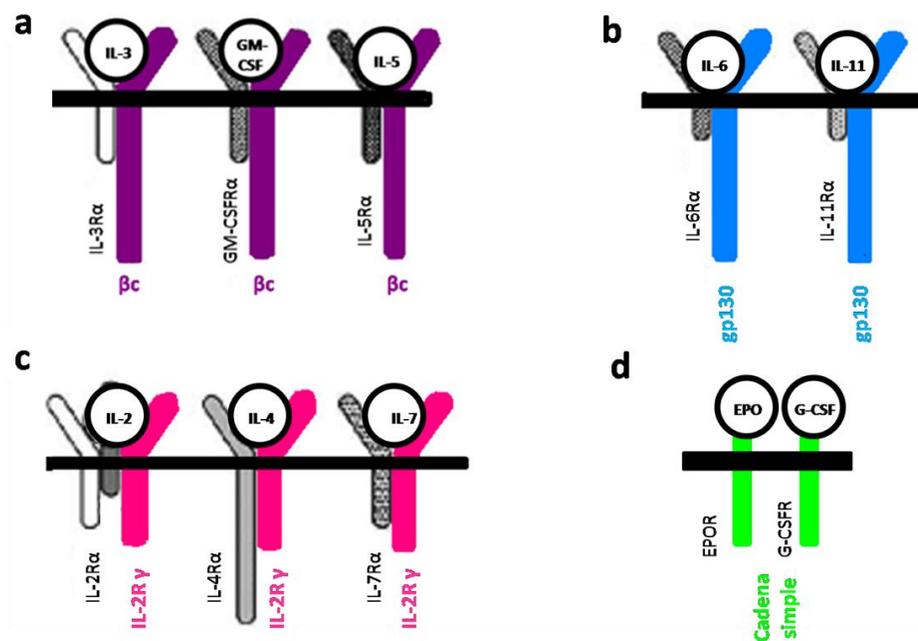


Figura 4. Clasificación de receptores de citocinas: a) receptores de la cadena- β , b) receptores de la cadena gp130, c) receptores de la cadena- γ , y d) receptores que presentan una cadena simple (modificado de ^{6,35,36}).

Existen otro tipo de receptores de citocinas que presentan un dominio intracelular de tirosina cinasa, donde su principal característica es la auto-fosforilación, tal es el caso de los receptores para el M-CSF y el SCF. Otros receptores de citocinas no cuentan con un dominio intracelular tirosina cinasa como: el receptor para GM-CSF, G-CSF, IL-3 y TPO, por lo que tienen que reclutar otras proteínas para transmitir señales al interior de las células ^{37,38,39}.

Inflamación

Los organismos superiores continuamente utilizan un sofisticado, flexible y letal sistema de defensa que ayuda a combatir el crecimiento y persistencia, facilitando la eliminación de los virus, bacterias y parásitos entre otros. Nuestro organismo dispone de un sistema eficaz contra casi todo tipo de agentes patógenos llamado sistema inmune, que da origen a dos tipos diferentes de respuesta, la respuesta del sistema inmune innato y la respuesta de sistema inmune adaptativo^{40,41}.

En la respuesta del sistema inmune innato participan macrófagos, granulocitos, NK y proteínas solubles como el sistema del complemento, en conjunto forman la primera línea de defensa que presenta el organismo. Por otro lado en la respuesta del sistema inmune adaptativo participan los linfocitos T y los linfocitos B, éstos generan exquisitamente una respuesta específica efectora letal para virus, bacterias, entre otros, creando memoria contra estos microorganismos⁴².

El sistema inmune innato se activa cuando un organismo sufre un daño en sus células y tejidos vascularizados, ya sea por lesión celular, muerte o por agentes patógenos como bacterias, hongos, virus o por cualquier otro agresor de la naturaleza ya sea, biológico, químico, físico o mecánico. Esta activación genera una respuesta que se conoce como inflamación^{43,44}. Durante la inflamación el sistema inmune recluta células y efectores solubles que ayudan a coordinar de manera inmediata la respuesta contra los agentes patógenos así como la reparación del tejido dañado, produciendo una resolución orquestada necesaria para mantener la homeostasis del sistema^{45,46}.

Las primeras células en llegar al sitio de inflamación son los granulocitos-neutrófilos seguido de los monocito-macrófagos, estos dos linajes celulares tienen la característica principal de fagocitar y degradar agentes patógenos, un evento conocido como fagocitosis^{47,48,49}.

Cuando los neutrófilos y macrófagos reconocen el sitio de inflamación, traspasan el endotelio vascular hacia el tejido infectado mediante moléculas de adherencia llamadas selectinas como la ICAM-1 y la ICAM-2 presentes en leucocitos, así como las integrinas CD11/CD18. Estas moléculas ayudan al reclutamiento, adherencia y paso de los granulocitos y macrófagos hacia el sitio de inflamación, en donde, las células reconocen, fagocitan y en el caso de los macrófagos procesan al agente patógeno, convirtiéndolo en pequeños péptidos los cuales, de ser necesario pueden unirse al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), para ser presentados a los linfocitos Tc y así activar la respuesta inmune adaptativa. Todo este proceso en conjunto puede causar irritación, edema, dolor y hasta fiebre dependiendo de la magnitud de la infección, efectos característicos del proceso que se conoce como inflamación^{50,51} (**figura 5**).

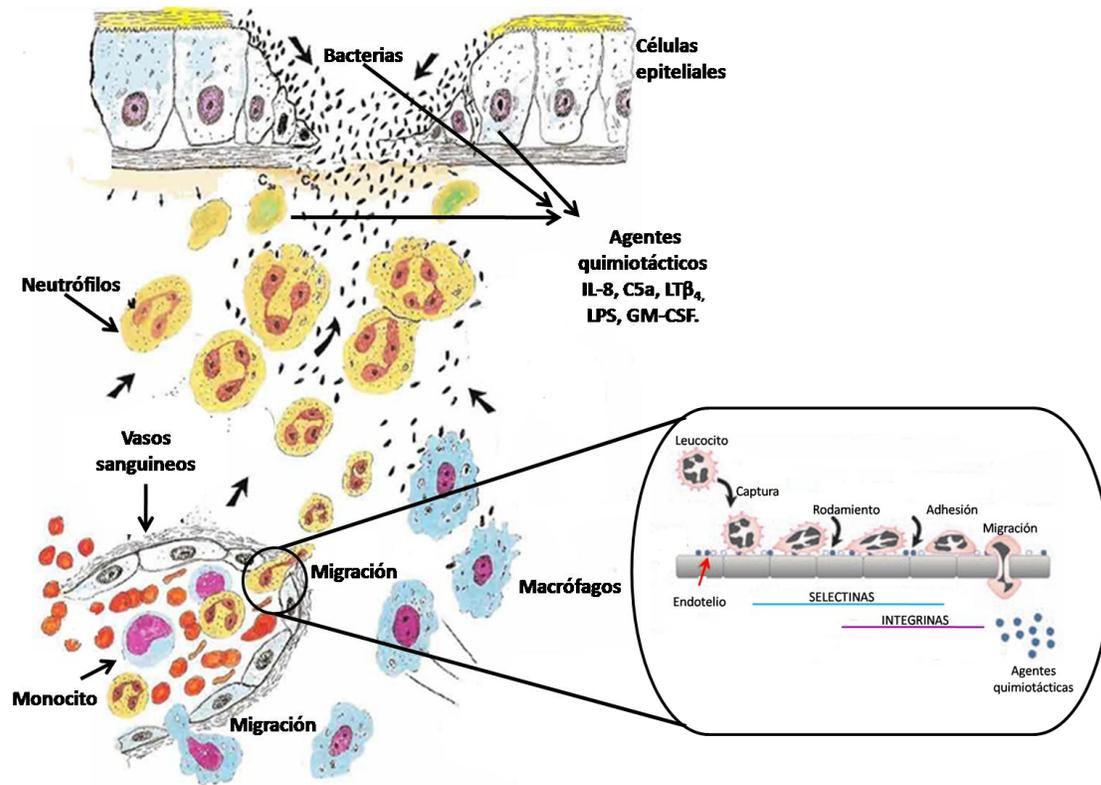


Figura 5. La inflamación se genera cuando un agente patógeno (bacteria) se infiltra en el organismo, esto desencadena una respuesta celular donde participan principalmente los fagocitos (neutrófilos y macrófagos), estas células pueden ser atraídas al sitio de inflamación, desde la médula ósea, debido a agentes quimiotácticos secretados por las células epiteliales, el agente patógeno o incluso por los neutrófilos y macrófagos que son residentes del tejido o que se encuentran en circulación. Cuando los fagocitos llegan al sitio de inflamación, estos se adhieren al endotelio y lo atraviesan por medio de moléculas de adhesión como selectinas e integrinas. Dentro del tejido dañado los fagocitos reconocen, fagocitan y eliminan al agente patógeno. Esta respuesta puede ir acompañada de irritación, dolor, edema y fiebre dependiendo de la magnitud de la infección o daño (modificado de ^{47,48,49,50}).

La génesis de los neutrófilos se lleva a cabo principalmente en la médula ósea, a este evento se le llama granulopoyesis donde a partir de una CTH pasando por diferentes estadios dará origen a granulocitos-neutrófilos maduros (figura 6). Todo este proceso se desarrolla en un lapso de tiempo de aproximadamente 14 días⁵². La vida promedio de un neutrófilo maduro es de 6 a 24 horas y en presencia de una infección se producen normalmente de 10^{11} hasta 10^{12} neutrófilos diariamente. Los neutrófilos pueden ser atraídos al sitio de infección, debido a factores secretados por células endoteliales y/o bacterias, o por agentes quimioatrayentes como la IL-8 (proteína activadora de acción atrayente de neutrófilos tipo 1, “NAP-1”), el GM-CSF y proteínas del complemento como C5a, leucotrienos de tipo β_4 ($LT\beta_4$), o por productos bacteriales como lipopolisacáridos (LPS) y péptidos de N-formyl^{53,54}.

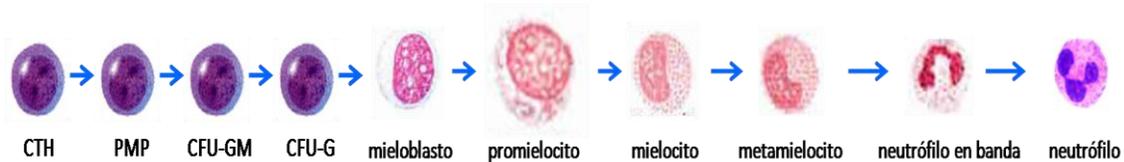


Figura 6. Etapas de diferenciación de granulocitos en médula ósea. A partir de una célula tronco hematopoyético (CTH), da origen al progenitor multipotente (PMP), de éste se generan la unidad formadora de colonias granulo-monocíticas (CFU-GM) que a su vez originan a la unidad formadora de colonias granulocíticas (CFU-G) y continúan su proceso de diferenciación hasta llegar al neutrófilo maduro (modificado de^{52,53,54})

Como anteriormente mencionamos las segundas células en llegar al sitio de la inflamación son los macrófagos. La génesis de macrófagos (monocitopoyesis) se lleva a cabo también en médula ósea donde de manera similar al granulocito, a partir de una CTH se originaran los monocito-macrófagos^{55,56} (figura 7).

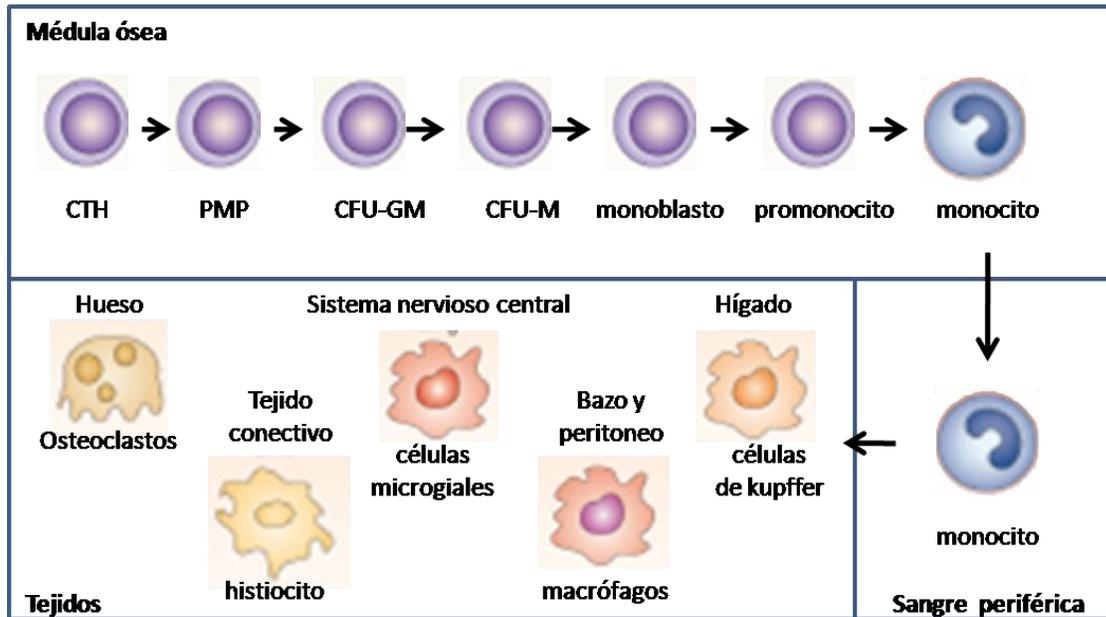


Figura 7. Etapas de diferenciación de células de macrófagos. A partir de una célula tronco hematopoyética (CTH) se generan las unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas (CFU-GM) que a su vez dan origen a la unidad formadora de colonias de macrófagos (CFU-M) y así continúa su proceso de diferenciación hasta llegar al monocito, estos migran por el torrente sanguíneo hacia diferentes órganos para culminar su diferenciación donde adquieren diferentes nombres dependiendo del tejido en el que residan (modificado de^{55,56}).

Los monocitos en sangre periférica representan en humano y ratón, alrededor del 5-10% de los leucocitos. Su vida es relativamente larga, en humano alrededor de 3 días y en ratón 1 día^{57,58,59}. Los monocitos migran por el torrente sanguíneo hacia otros tejidos donde adquieren diferentes nombres por ejemplo: en hueso se conocen como *osteoclastos*; en alveolos y sistema nervioso son conocidos como *células microgiales*; en tejido conectivo como *histiocitos*; en el tracto gastrointestinal e hígado como *células de kupffer*; mientras que en bazo y peritoneo se llaman *macrófagos*⁵⁵.

Dentro de las funciones fisiológicas los monocitos y su progenie diferenciada (macrófagos), juegan papeles importantes como reguladores y efectores de la respuesta inmune innata y adaptativa^{40,60}, tales funciones incluyen: presentación de antígenos y fagocitosis⁶¹.

La activación de monocitos y macrófagos incrementan la producción de IL-1, IL-6, TNF- α e INF-1 β , citocinas que están involucradas en la regulación de la hematopoyesis. Además pueden liberar óxido nítrico lo que produce una actividad citostática o citotóxica contra virus, bacterias, hongos y células tumorales⁶².

Tanto macrófagos y granulocitos pueden ser identificados mediante su morfología o por medio de la expresión de diferentes marcadores específicos del linaje (inmunofenotipo), tal es el caso del F4/80 y CD11b para el linaje monocito-macrófago y para el linaje granulocítico Ly6G conocido también como Gr-1^{63,64,65}.

Caseínas en la hematopoyesis e inflamación

En años recientes se ha reportado que algunas moléculas diferentes a las citocinas tienen la capacidad de regular la hematopoyesis tal es el caso del ATRA, un derivado de la vitamina A, ampliamente utilizado en el tratamiento contra la leucemia promielocítica aguda⁶⁶, y algunos componentes de la leche como las caseínas.

La leche está formada por dos componentes la parte protéica y la parte líquida. La parte protéica de la leche está conformada por la caseína, la alfa-lactoalbúmina, la beta-lactoglobulina, la lactoferrina y la peroxidasa^{68,69}. De éstas, las caseínas ocupan alrededor del 80% del total de proteínas dentro de la leche y están compuestas por cuatro clases de cadenas polipeptídicas llamadas alfa s₁, alfa s₂, beta y kapa-caseína, su peso molecular es de 23.6 KDa, 25.2 KDa, 23.9 KDa y 19 KDa respectivamente^{2,70} y en conjunto forman micelas.

El caseinato de sodio (CasNa) es una sal derivada de la caseína, se obtiene disolviendo caseína en hidróxido de sodio y posteriormente someténdola a una evaporación obteniendo de esta forma un polvo blanco, insaboro, inoloro, con una mayor solubilidad en agua. Debido a su excelente valor nutricional el CasNa es ampliamente utilizado en la industria alimenticia como fuente de proteínas en cereales y especialmente en productos para bebés así como productos para pacientes diabéticos⁷¹.

La caseína, el CasNa, el TioNa así como el HC, son moléculas ampliamente utilizadas en modelos de inflamación, bajo condiciones controladas, ya que en el sitio de inyección se favorece la acumulación de granulocitos^{72,73}. Otros estudios muestran que el CasNa al ser inyectado en cavidad peritoneal de ratones eleva la concentración de G-CSF, M-CSF y GM-CSF^{72,73,74}.

Antecedentes de nuestro grupo de trabajo muestran que el CasNa inhibe la proliferación de la línea celular hematopoyética multipotencial 32D de ratón, la cual es dependiente de IL-3, e induce su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago⁷⁵; inhibe la proliferación de la línea celular leucémica mielomonocítica WEHI-3, así como las líneas leucémicas macrofágicas J774 y P388, todas de ratón^{67,76}; induce la diferenciación de neutrófilos en banda hacia neutrófilos segmentados, tal como lo hace G-CSF⁷⁷; e induce la proliferación y diferenciación de CMN normales provenientes de médula ósea de ratones BALB/c en presencia de IL-3^{78,79}. El conjunto de datos anteriores indican que el CasNa es un agente proinflamatorio, que tiene la capacidad de modular la hematopoyesis, *in vitro e in vivo*, sin embargo se desconoce si algún otro agente proinflamatorio también pueda regular la hematopoyesis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Resultados de nuestro grupo de trabajo muestran que el CasNa, un agente proinflamatorio, regula la hematopoyesis de células normales de ratón, sin embargo se desconoce si otros agentes proinflamatorios tales como el TioNa e HC presenten el mismo efecto promotor de la hematopoyesis *in vitro e in vivo*.

JUSTIFICACIÓN

La segunda causa de muerte a nivel mundial se debe a enfermedades oncológicas, incluyendo a la leucemia^{101,102}. Particularmente la leucemia mieloide aguda es una patología muy agresiva que provoca la muerte en más de dos tercios de los pacientes que cursan con esta neoplasia, a pesar de todos los conocimientos científicos y desarrollo de nuevas terapias, debido a la ausencia de selectividad entre célula normal y tumoral. Recientemente nuestro grupo de trabajo publicó que el CasNa elimina células leucémicas, pero en combinación con la IL-3 promueve la proliferación de células hematopoyéticas normales^{67,78}.

El CasNa, el TioNa y el HC, son reconocidos agentes proinflamatorios puesto que inducen la acumulación de granulocitos en el sitio de administración pero no se conoce si todos estos promueven la hematopoyesis normal.

HIPÓTESIS

Se conoce que la caseína y el CasNa son agentes proinflamatorios, sin embargo existen otras moléculas como el TioNa e HC que presentan la misma propiedad. Nuestro grupo de trabajo ha mostrado que el CasNa, además de inducir una reacción inflamatoria, también induce la proliferación de células hematopoyéticas normales *in vitro* e *in vivo*, por lo tanto se esperaría que el tratamiento con TioNa e HC, (ambos proinflamatorios), también promuevan la proliferación de células de médula ósea *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del caseinato de sodio, tioglicolato de sodio e hidrolizado de caseína en la proliferación y diferenciación de células mononucleadas de médula ósea.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar si el caseinato de sodio, tioglicolato de sodio e hidrolizado de caseína inducen acumulación de granulocitos y macrófagos en el lugar de inoculación.
- Evaluar si el caseinato de sodio, tioglicolato de sodio e hidrolizado de caseína, inducen la proliferación de células mononucleadas de médula ósea.
- Evaluar si el caseinato de sodio, tioglicolato de sodio e hidrolizado de caseína, inducen la diferenciación de células mononucleadas de médula ósea.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de células de cavidad peritoneal

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c (obtenidos del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza) de 2 a 3 meses de edad, mantenidos en condiciones de esterilidad, con agua y alimento *ad libitum*. Se formaron 6 grupos de ratones (n=3 cada uno) y se trataron con una sola inyección vía intraperitoneal de 1ml de CasNa (Spectrum, USA), TioNa (Bioxon, USA), HC (Sigma, USA) y también Alb (Research Organics, USA) como una proteína inocua, todas en concentraciones de 3 y 10% (p/v) (apéndice), otro grupo de ratones recibieron solo 1ml de agua Milli-Q (VEH) y el último grupo no recibió ningún tratamiento (control). A las 16 horas después de la inyección, se sacrificaron los ratones, de los seis grupos, por dislocación cervical. Para la obtención de las células se realizó un lavado de cavidad peritoneal con 10 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (apéndice), después se contaron bajo el microscopio en un hemocitómetro.

Morfología de células en cavidad peritoneal

Para observar la morfología se realizaron frotis de células de cavidad peritoneal de cada uno de los grupos y enseguida fueron teñidas con Giemsa (Sigma, Méx) (proporción colorante-agua 1:9), se contaron 100 células por laminilla con tres repeticiones bajo el microscopio con un objetivo de 40x. Para la identificación morfológica de granulocitos se tomó en cuenta a las células que presentaran un núcleo estrecho formando una banda o bien células donde el núcleo este segmentado en 2 a 5 lóbulos, unidos por finos puentes cromáticos¹⁰³. En el caso de la identificación de monocito-macrófagos se tomaron en cuenta a las células de tamaño grande, de forma variable u oval así como presencia de pseudópodos. Núcleo en posición central o en la periferia, con citoplasma abundante y presencia o no de vacuolas¹⁰³.

Cultivo de CMN de médula ósea

Ratones hembra BALB/c sin tratamiento se sacrificaron por dislocación cervical, de éstas se obtuvieron los fémures y se aislaron las células totales de médula ósea, haciendo fluir medio de cultivo Iscove's (IMDM, Gibco BRL, USA) (apéndice) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, USA), posteriormente se separaron las CMN mediante un gradiente de densidad (ficol $\delta = 1.077$ g/ml) (Sigma, St Louis, M). Después se realizó una prueba de viabilidad mediante la técnica de exclusión al azul tripano (Sigma, USA), donde se tomó una muestra de CMN a la cual se le adicionó el colorante en una proporción 1:1, las células teñidas por el colorante fueron consideradas muertas, posteriormente se cuantificaron células vivas y muertas. Por último se cultivaron las células en IMDM suplementado con 15% de SFB (Gibco BRL, USA), a una densidad de 1×10^5 cel/ml en placas de 96 pozos (Corning NY, USA), con diferentes tratamientos: control (sin tratamiento), sólo Interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3) (5 ng/ml), VEH + rmIL-3, CasNa + rmIL-3, HC + rmIL-3, TioNa + rmIL-3, Alb + rmIL-3 a distintas concentraciones (0.5, 1, 2 y 4 mg/ml). Los cultivos fueron mantenidos durante 5 días a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y humedad a punto de rocío.

Evaluación de la proliferación por cristal violeta en cultivos de CMN

Después de mantener el cultivo por 5 días, se evaluó la proliferación celular mediante la técnica de cristal violeta, un colorante básico que se adhiere a las partes ácidas del ADN, la cantidad de colorante absorbido por cada núcleo es proporcional al número celular. Brevemente se fijó a las células con glutaraldehído al 1% (apéndice) durante 2 horas, posteriormente se retiró y se adicionó el colorante de cristal violeta (apéndice) el colorante que no se unió al núcleo se removió mediante lavados con agua y por último se adicionó ácido acético al 10%, manteniendo la placa en agitación por 20

minutos, finalmente se hizo la lectura en un espectrofotómetro (Tecan A-5002, Austria) a una densidad óptica de 570 nm.

Evaluación de la proliferación por 3-(4,5-dimetiltazol-2-y-1)-5-(3-carbimetoxifenil)-2-(sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) en cultivos de CMN

También se evaluó la proliferación celular a través de la técnica colorimétrica MTS, la cual consiste en la conversión de la sal de tetrazolium, por la NADPH que es el producto de la actividad mitocondrial de células viables, a un compuesto llamado formazán, soluble en el medio. La cantidad de formazán producido por la deshidrogenasa es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. Al quinto día de cultivo se agregaron 20 µl de MTS a cada pozo de CMN, posteriormente se dejó incubar durante 4 horas y finalmente se realizó la lectura en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 490 nm.

Morfología de agregados celulares en cultivos de CMN

Para evaluar la morfología se cultivaron CMN, en las condiciones mencionadas anteriormente, en presencia de rmIL-3 (5ng/ml) más CasNa o Alb con 2 o 4 mg/mL, TioNa e HC con 0.5 y 2 mg/ml, estas concentraciones se tomaron a partir de los ensayos de proliferación *in vitro* tomando en cuenta la presencia de una mayor proliferación o donde se observó una menor inhibición. Al término del tiempo de cultivo las células fueron teñidas con Wright, posteriormente se evaluó la morfología de agregados celulares, integrados a partir de 20 células o más, bajo el microscopio a un campo de 40x. Se tomó el criterio mencionado anteriormente para identificar poblaciones de granulocitos y macrófagos.

Evaluación de la expresión de Gr-1 y CD11b en un cultivo de CMN de médula ósea

A partir de un cultivo de CMN tratadas con CasNa, TioNa, HC y Alb (todas en concentración de 2mg/ml), se obtuvieron las células de cada condición y fueron incubadas, durante 20 min, con los siguientes anticuerpos: Gr-1 (clona RB6-8C5) (eBioscience, San Diego, CA, USA) conjugado con ficoeritrina (PE) y CD11b (M1/70) (eBioscience, San Diego, CA, USA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Posteriormente se realizó un lavado con PBA, para retirar el exceso de anticuerpos, y después se fijaron las células con paraformaldehído. Se leyeron 5×10^5 eventos por cada condición en un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson, CA, USA) con el software BD Cell Pro v.5.1.1 (Becton Dickinson). Para el análisis de los resultados se seleccionó la región de las poblaciones de granulocitos y macrófagos a partir de la granularidad y tamaño, una vez separadas las regiones se procedió a medir la expresión de Gr-1 y CD11b respectivamente.

Evaluación de proliferación mediante el Índice Mitótico (IM)

Una forma de evaluar la proliferación *in vivo* es utilizando el IM, un parámetro que permite observar células que se encuentran en división (mitosis) a través de la exposición de sus cromosomas. Seis grupos de ratones BALB/c se les inyectó 1 ml de CasNa, TioNa, HC y Alb en concentraciones de 3, 5 y 10% (p/v) (apéndice), vía intraperitoneal, cada 48 horas durante 6 días, al séptimo día se sacrificaron, dos horas antes se les inyectó colchicina 0.1% (Sigma, USA), posteriormente se aislaron las células totales de médula ósea de los ratones de cada grupo y se dejaron reposar por 45 min en una solución de cloruro de potasio (KCl 0.047M) (apéndice), después se fijaron con una solución de metanol-ácido acético (3:1). Finalmente se expandió el material genético sobre portaobjetos mediante la técnica de goteo, enseguida fueron teñidas con Giemsa (proporción agua-colorante 1:9) y se leyeron 1000 células por laminilla bajo el microscopio a un campo de 40x, por último se obtuvo el porcentaje (%) del IM con la siguiente fórmula:

$$\%IM = \frac{\text{células en división}}{\text{células totales}} \times 100$$

Manejo de datos y análisis estadísticos

Los resultados se presentaron como la media y la desviación estándar (\pm) de tres experimentos realizados de manera independiente. La diferencia significativa se obtuvo mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Tukey o Dunnett $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

El CasNa, el TioNa, el HC y la Alb inducen migración de células en cavidad peritoneal de ratones BALB/c.

Existe evidencia de que el CasNa, el TioNa y el HC son moléculas proinflamatorias^{32,72,81,85}, para corroborar este efecto bajo nuestras condiciones de trabajo se procedió a inyectar, por vía intraperitoneal, a ratones BALB/c con 1 ml de cada una de las moléculas proinflamatorias a diferentes concentraciones, incluyendo Alb como un tratamiento inocuo. Dieciséis horas después de la inyección se aislaron las células de cavidad peritoneal y se evaluó bajo el microscopio el número celular.

La administración de 1 ml al 3 % de cada molécula incrementó el número de células en cavidad peritoneal, aunque sólo el CasNa y TioNa mostraron un aumento significativo con respecto al control y VEH. En cuanto a la administración de una solución al 10%, CasNa, HC y Alb inducen de manera significativa un aumento del número de células, mientras que el TioNa induce la muerte de los ratones (**figura 8**). Es de resaltar que el CasNa en ambas concentraciones induce un mayor incremento comparado con los demás proinflamatorios.

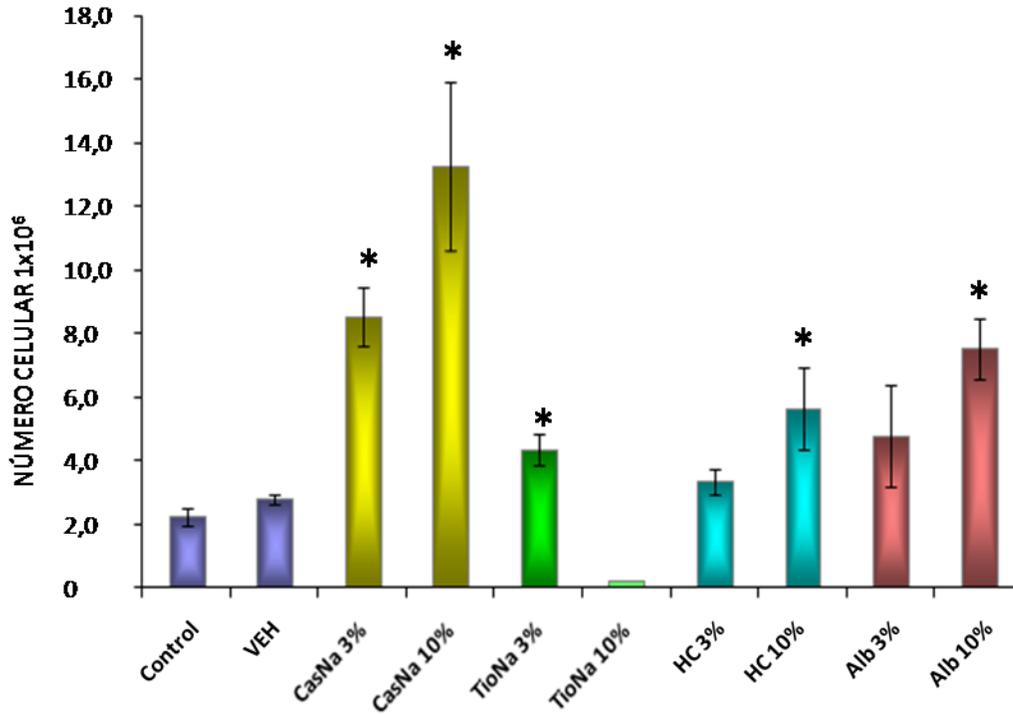


Figura 8. Número de células en cavidad peritoneal de ratones BALB/c. Control, ratones no tratados; VEH, solo agua Milli-Q; CasNa, caseinato de sodio; TioNa, tioglicolato de sodio; HC, hidrolizado de caseína; Alb, albúmina. *Diferencia significativa con respecto al control y VEH $p \leq 0.05$.

El CasNa, TioNa, HC y Alb inducen migración de células principalmente del linaje granulocítico.

Una vez observado que el CasNa, el TioNa, el HC y la Alb inducen migración de células se procedió a determinar su morfología celular. Los resultados muestran que la morfología predominante en ratones tratados con CasNa, TioNa, HC y Alb corresponde principalmente a células del linaje granulocítico (**figura 9**).

Al evaluar el porcentaje de la población se observó un aumento significativo de granulocitos con todos los tratamientos (3 y 10%), en tanto que el porcentaje de macrófagos y linfocitos disminuyó. Al evaluar el número celular observamos que la población de granulocitos aumenta en ratones tratados con CasNa (3 y 10%) y Alb (10%) con respecto al control y VEH, aunque con CasNa al 10% se eleva más el número celular. Por otra parte el número de macrófagos también se incrementa en ratones tratados con CasNa (3 y 10%) y disminuye con HC (3 y 10%) comparado con el control y VEH, mientras que con el TioNa y Alb no se observó ninguna diferencia, por último el número de linfocitos disminuye significativamente independientemente del agente proinflamatorio (**Tabla 1**).

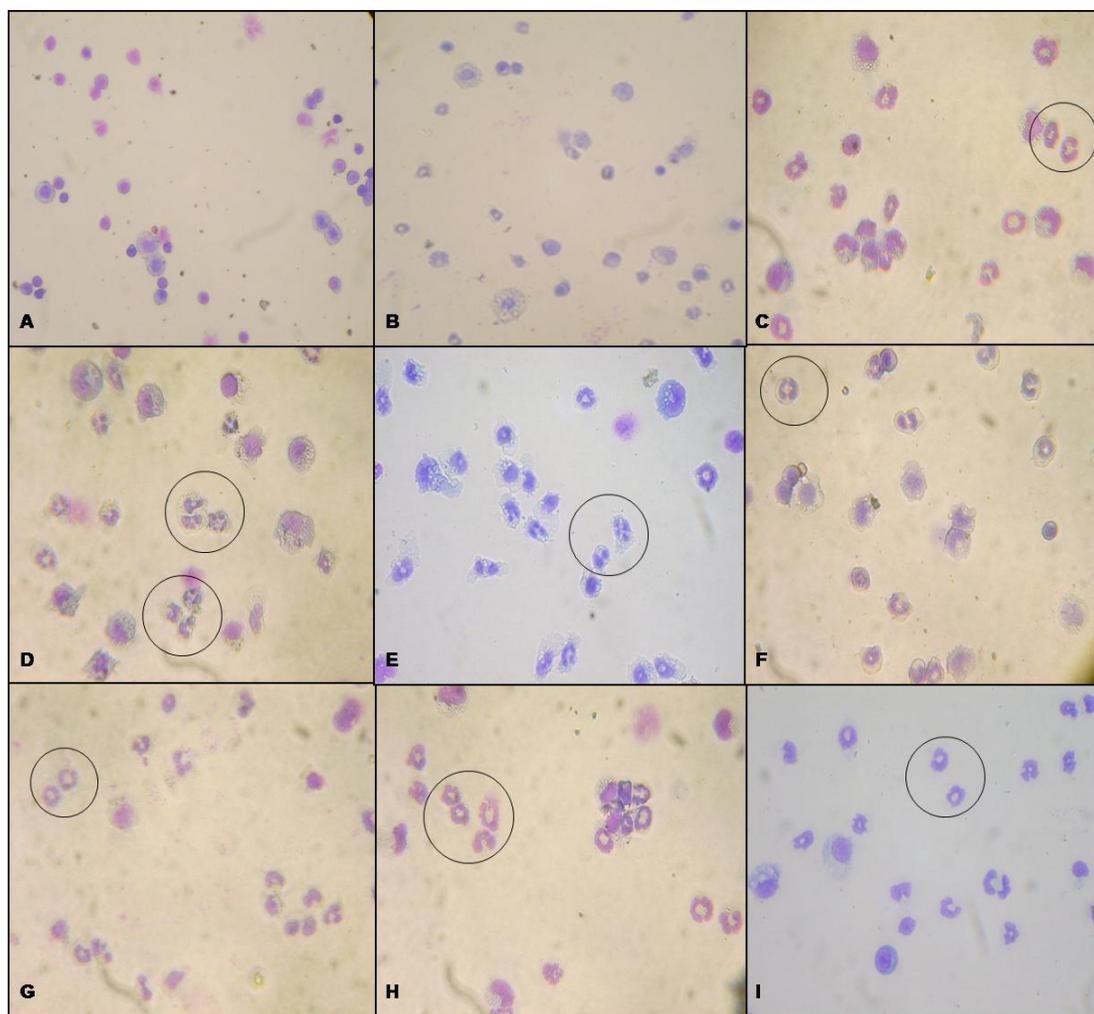


Figura 9. Morfología de células en cavidad peritoneal de ratones BALB/c. A) control, ratones no tratados; B) VEH, solo agua Milli-Q; C) TioNa, tioglicolato de sodio al 3%; D) CasNa, caseinato de sodio al 10%; E) CasNa al 3%; F) HC, hidrolizado de caseína al 10%; G) HC al 3%; H) Alb, albúmina al 10% e I) Alb al 3%. Las células marcadas con un círculo corresponden a granulocitos.

TRATAMIENTO	MORFOLOGÍA		
	GRANULOCITOS	MACRÓFAGOS	LINFOCITOS
	% (Núm. cel x10 ⁶)	% (Núm. cel x10 ⁶)	% (Núm. cel x10 ⁶)
Control	1 ± 0.7 (0.023 ± 0.010)	91.5 ± 0.7 (2.19 ± 0.970)	7.5 ± 2.1 (0.179 ± 0.079)
VEH	27 ± 9.1 * (0.770 ± 0.405)	70 ± 7.0 (1.99 ± 0.579)	3.0 ± 1.4* (0.085 ± 0.024)
CasNa 3%	55.5 ± 4.9 * (4.75 ± 0.515) *	44.5 ± 3.5 * (3.81 ± 0.413) *	0 ± 0 *
CasNa 10%	77.0 ± 8.4 * (10.24 ± 2.04) *	22.0 ± 1.4 * (3.59 ± 0.583) *	1.0 ± 0 * (0.133 ± 0.026)
TioNa 3%	58 ± 4.2 * (2.89 ± 0.446) *	42 ± 4.9 * (2.12 ± 0.323)	0 ± 0 *
HC 3%	57 ± 4.2 * (1.97 ± 0.699) *	39.0 ± 2.8 * (1.35 ± 0.478)	4.0 ± 1.4 * (0.138 ± 0.049)
HC 10%	69 ± 1.4 * (4.36 ± 1.605) *	29 ± 3.5 * (1.96 ± 0.478)	0 ± 0 *
Alb 3%	45.2 ± 4.2 * (2.01 ± 0.931) *	54.8 ± 3.2 * (2.66 ± 1.231)	0 ± 0 *
Alb 10%	70.0 ± 1.4 * (5.69 ± 0.969) *	30 ± 2.8 * (2.44 ± 0.415)	0 ± 0 *

Tabla 1. Porcentaje y número de células correspondiente a granulocitos, macrófagos y linfocitos provenientes de cavidad peritoneal de ratones BALB/c. Control, ratones no tratados; VEH, solo agua Milli-Q; CasNa, caseinato de sodio; TioNa, tioglicolato de sodio; HC, hidrolizado de caseína y Alb, albúmina.*Diferencia significativa con respecto al control y VEH $p \leq 0.05$.

El CasNa sinergiza la proliferación inducida por IL-3 en cultivos de CMN de médula ósea de ratones BALB/c.

Al confirmar que el CasNa, el TioNa y el HC son agentes proinflamatorios procedimos a evaluar si también modulan la proliferación *in vitro* de células de médula ósea de ratones BALB/c. Con este propósito se cultivaron CMN en presencia o ausencia de rmIL-3 más CasNa, TioNa, HC o Alb a diferentes concentraciones.

Al observar la proliferación bajo el microscopio se observó que en los cultivos con solo CasNa, TioNa, HC o albúmina semejan a los cultivos en ausencia de rmIL-3 (dato no mostrado). El cultivo de CMN con rmIL-3 más CasNa muestra una mayor densidad celular en comparación con las demás moléculas, vehículo o sólo rmIL-3 (**figura 10**). Cuando se evaluó la proliferación utilizando la técnica de cristal violeta se encontró que el CasNa en combinación con rmIL-3 produce un aumento significativo sobre la proliferación en forma dosis dependiente, diferencia significativa que se mantiene al compararla con las demás moléculas, mientras que la Alb no la altera y el TioNa e HC la disminuyó significativamente en forma dosis dependiente con respecto a sólo la rmIL-3 o vehículo (**figura 11**).

Después de evaluar la proliferación con cristal violeta, se empleó una técnica más sensible para corroborar el efecto anterior, utilizando el kit de MTS. Los resultados muestran un patrón similar al obtenido con cristal violeta, aunque con el CasNa se observó un aumento significativo de 2 veces más con respecto a la rmIL-3 y VEH, la Alb e HC (0.5 y 1 mg/ml) también aumentan la proliferación pero no existe una diferencia significativa, mientras que el TioNa, en todas las concentraciones, la inhibe significativamente pero no en forma dosis respuesta. Finalmente el HC inhibe la proliferación solo con las concentraciones a 2 y 4 mg/ml con respecto a rmIL-3 o VEH (**figura 12**).

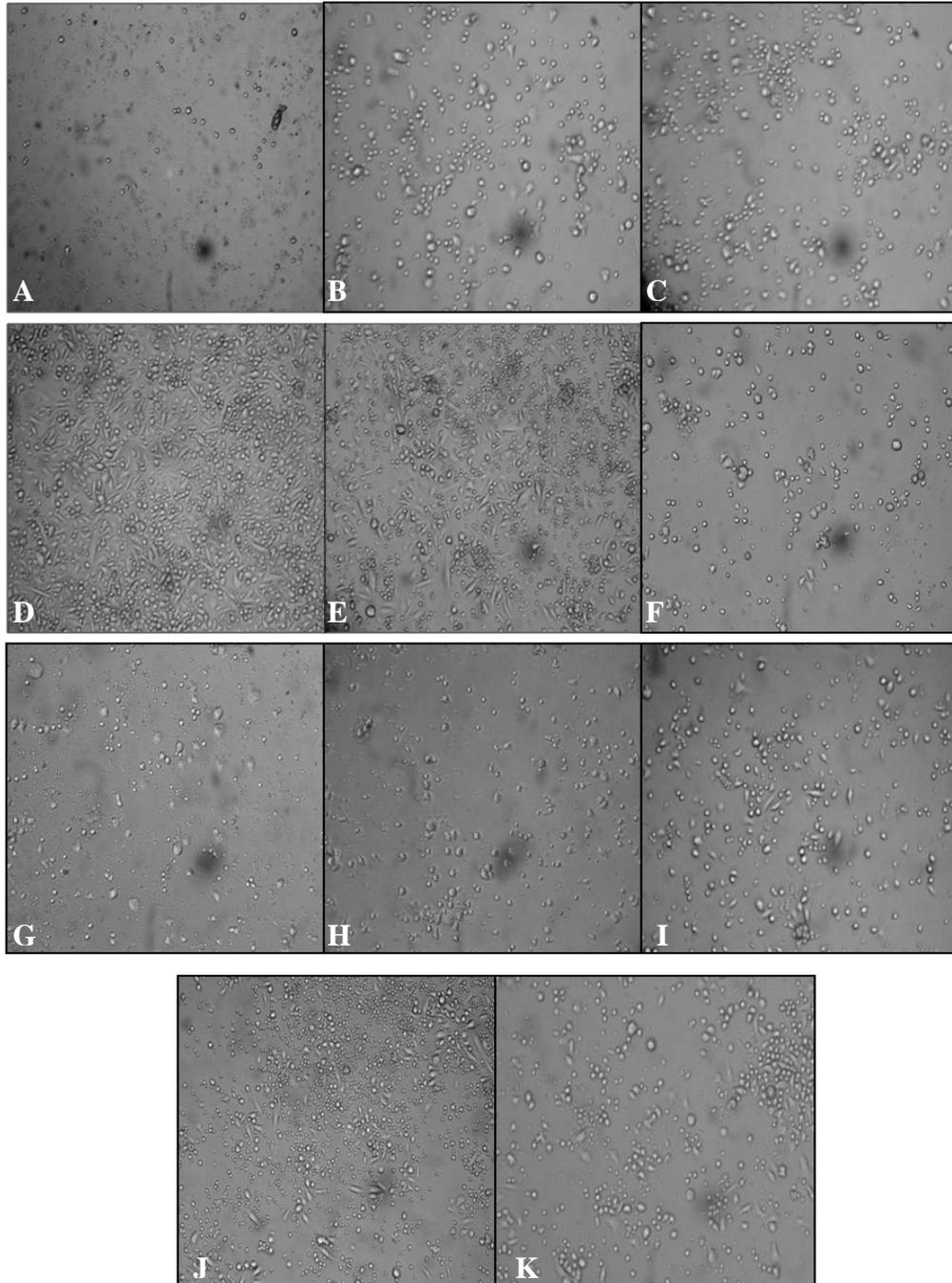


Figura 10. Cultivo de CMN de médula ósea de ratones BALB/c en presencia o ausencia de rmIL-3. A) control, sin rmIL-3; B) rmIL-3, Interleucina-3 recombinante de ratón; C) VEH, agua Milli-Q + rmIL-3; D) CasNa, caseinato de sodio 4mg/ml + rmIL-3; E) CasNa 2mg/ml + rmIL-3; F) TioNa, tioglicolato de sodio 1mg/ml + rmIL-3; G) TioNa 0.5mg/ml + rmIL-3; H) HC, hidrolizado de caseína 1mg/ml+ rmIL-3; I) HC 0.5 mg/ml+ rmIL-3; J) Alb, albúmina 4 mg/ml+ rmIL-3 y K) Alb 2mg/ml+ rmIL-3.

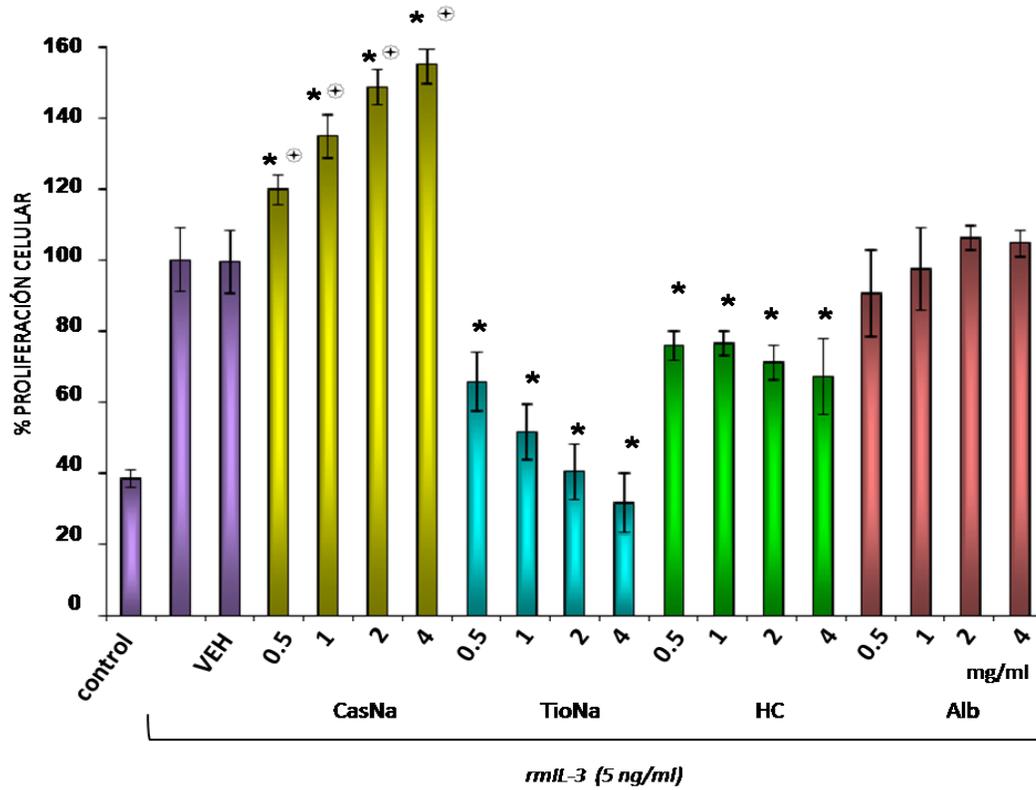


Figura 11. Proliferación celular evaluada por la técnica de cristal violeta en cultivos de CMN de médula ósea de ratones BALB/c. Control, células no tratadas; rmIL-3, interleucina-3 recombinante de ratón; VEH, agua Milli-Q; CasNa, caseinato de sodio; TioNa, tioglicolato de sodio; HC, hidrolizado de caseína; Alb, albúmina. *Diferencia significativa con respecto a la rmIL-3 y VEH. ⊕ Diferencia significativa con respecto a las demás condiciones de cultivo $p \leq 0.05$.

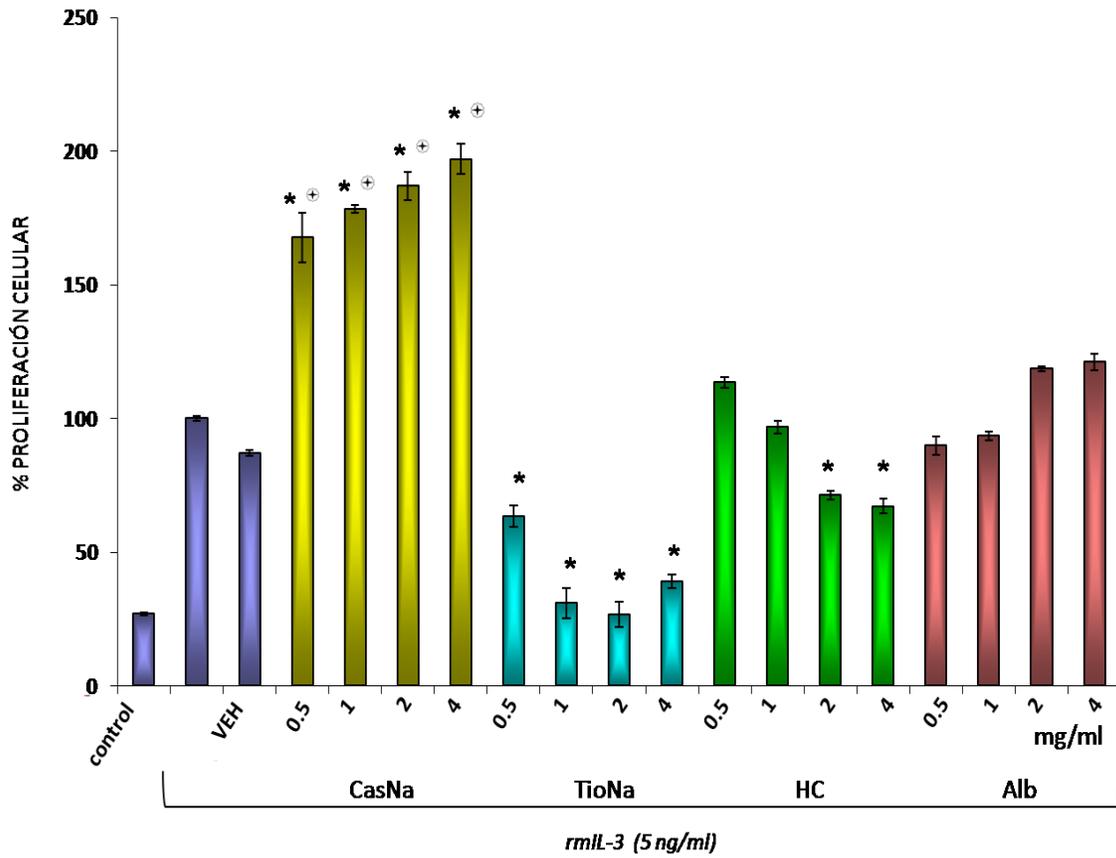


Figura 12. Proliferación celular evaluada por la técnica MTS en cultivos de CMN de médula ósea de ratones BALB/c. Control, células no tratadas; rmIL-3, interleucina-3 recombinante de ratón; VEH, agua Milli-Q; CasNa, caseinato de sodio; TioNa, tioglicolato de sodio; HC, hidrolizado de caseína; Alb, albúmina. *Diferencia significativa con respecto a la rmIL-3 y VEH. ⊕ Diferencia significativa con respecto a las demás condiciones de cultivo $p \leq 0.05$.

El CasNa promueve formación de agregados celulares de granulocitos y macrófagos.

Después de haber observado que el CasNa aumentaba la proliferación de CMN, se evaluó si induce diferenciación hacia un linaje en particular. Para ello las CMN cultivadas en presencia de rmIL-3 con o sin CasNa, TioNa, HC y Alb a diferentes concentraciones, fueron teñidas con Whright para evaluar la morfología. En la **figura 13** se observa la presencia de agregados celulares pertenecientes al linaje granulocítico (A y B), macrofágico (C y D) y de tipo blastoide (E) independientemente del tratamiento. Al evaluar el número de agregados de tipo granulocítico se observó que no existe una diferencia significativa con CasNa y Alb a 2 y 4 mg/ml, sin embargo con el TioNa e HC (0.5 y 2 mg/ml) disminuyó significativamente comparado con la rmIL-3 y VEH. En el caso de la población de granulocito-macrófago y macrófagos hubo un aumento significativo sólo con CasNa en ambas concentraciones. Por otra parte solo la concentración de 2mg/ml de CasNa incrementó significativamente el número de agregados de blastos, datos comparados con la rmIL-3 y VEH (**Tabla 2**).

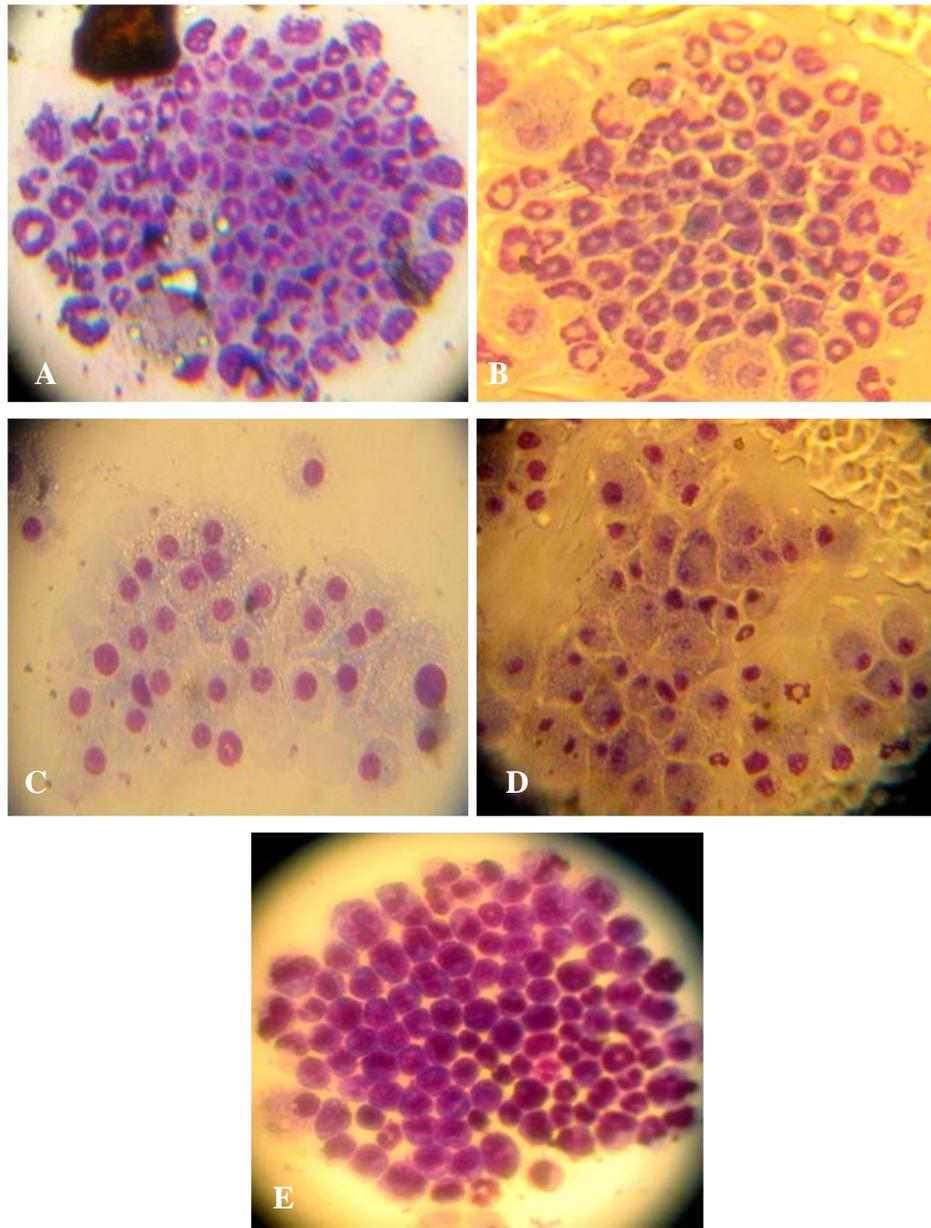


Figura 13. Imágenes representativas de la morfología de agregados de tipo granulocítico (A y B), macrofágico (C y D) y blastoide o inmaduras (E), en cultivos de CMN de médula ósea de ratones BALB/c.

CONDICIONES mg/ml	MORFOLOGÍA			
	GRANULOCITOS (Núm. Agr. Cel.)	GRANULOCITO- MACRÓFAGOS (Núm. Agr. Cel.)	MACRÓFAGOS (Núm. Agr. Cel.)	BLASTOS (Núm. Agr. Cel.)
IL-3	14 ± 5.2	4 ± 5.2	8.6 ± 6.4	6 ± 3.4
VEH	12.6 ± 4.6	8 ± 5.2	4.6 ± 4.6	10 ± 3.4
CasNa 2	18 ± 1	23.3 ± 3*	25 ± 1.1*	27 ± 9*
CasNa 4	16 ± 0	18 ± 2.3*	20 ± 5*	9.3 ± 6.6
TioNa 0.5	7 ± 7*	0 ± 0*	1 ± 1	7 ± 1
TioNa 2	3 ± 1*	1 ± 1	2 ± 0	0 ± 0
HC 0.5	3 ± 2*	1 ± 1	0 ± 0	5 ± 3
HC 2	3.3 ± 2.3*	1 ± 1	2 ± 0	0 ± 0
Alb 2	12 ± 2	8.6 ± 2.3	10 ± 4	10 ± 6.9
Alb 4	12 ± 5.9	5.3 ± 1.1	12 ± 2	9.6 ± 2

Tabla 2. Número de agregados celulares en cultivos de CMN de médula ósea de ratones BALB/c. rmIL-3, interleucina-3 recombinante de ratón; VEH, agua Milli-Q + rmIL-3; CasNa, caseinato de sodio+ rmIL-3; TioNa, tioglicolato de sodio+ rmIL-3; HC, hidrolizado de caseína+ rmIL-3; Alb, albúmina+ rmIL-3. *Diferencia significativa con respecto a la IL-3 y VEH p≤0.5.

El CasNa induce una mayor expresión de Gr-1 y CD11b en cultivos de CMN de médula ósea

Otra forma de identificar el linaje de las células es por medio de la detección de marcadores específicos. En cultivos de CMN de médula ósea tratadas con CasNa, TioNa, HC o Alb se evaluó, mediante citometría de flujo, la expresión de Gr-1 y CD11b para el linaje granulocítico y macrofágico respectivamente.

Los datos indican que por granularidad y tamaño existe un incremento en la población de granulocitos en CMN tratadas con CasNa mas rmIL-3 en comparación con solo la rmIL-3 y el VEH (**figura 14**), en cuanto a la población de macrófagos el aumento no fue tan evidente (**figura 15**). Cuando se evaluó la expresión de Gr-1, las células tratadas con CasNa aumentan significativamente el número de células positivas para este marcador comparado con las demás condiciones, la Alb y el HC no la alteran, mientras que el TioNa la disminuyó en relación con la rmIL-3 y VEH (**figura 16**). Las células tratadas con CasNa/rmIL-3 aumentan significativamente la expresión de CD11b (**figura 17**) con respecto a la rmIL-3 y VEH, mientras que las demás moléculas no la alteran.

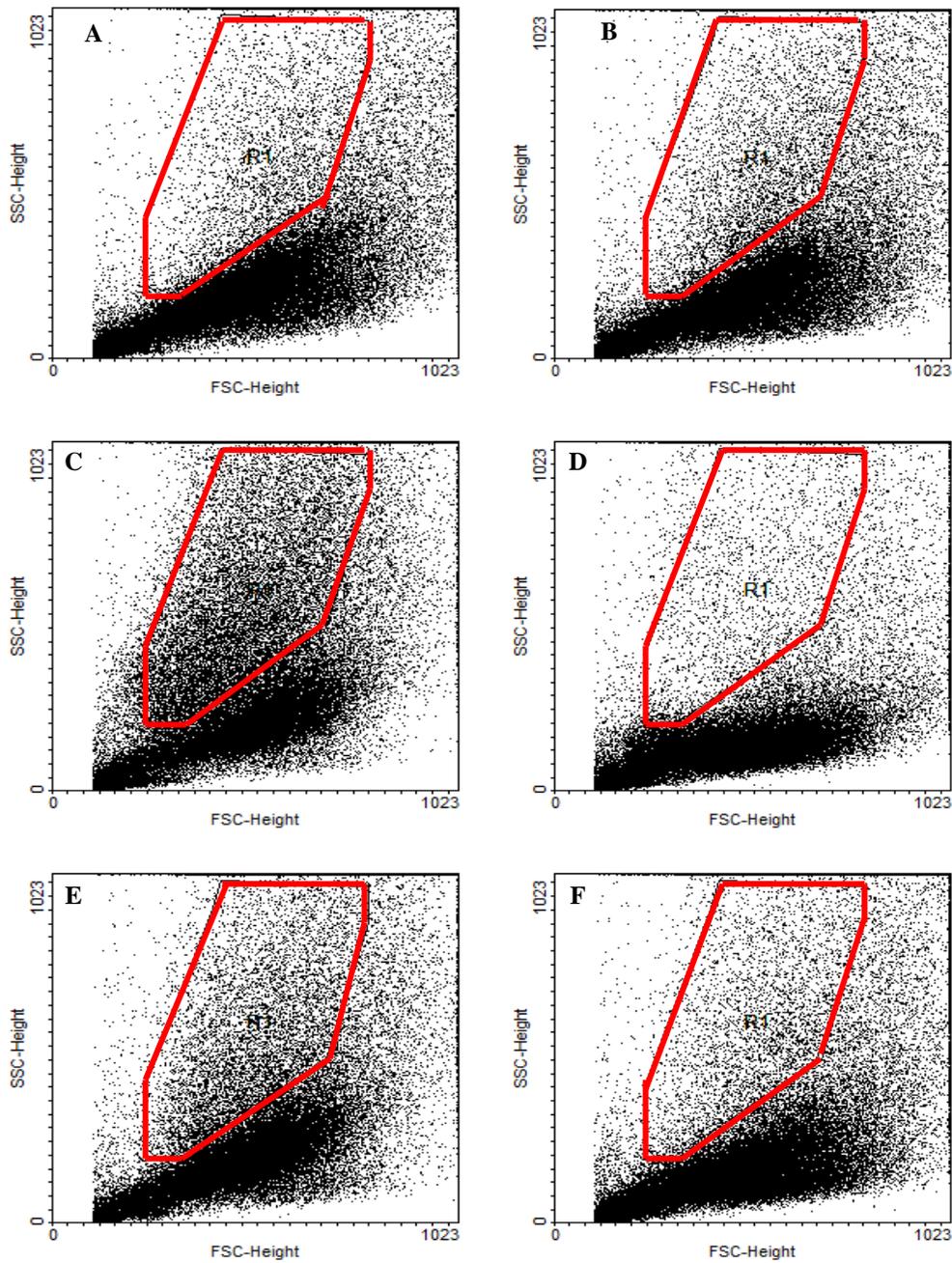


Figura 14. Región de granulocitos a partir de la granularidad (SSC) y tamaño (FSC) en cultivos de CMN de médula ósea de ratones BALB/c. A) rmIL-3, interleucina-3 recombinante de ratón; B) VEH, agua Milli-Q; C) CasNa, caseinato de sodio; D) TioNa, tioglicolato de sodio; E) HC, hidrolizado de caseína; F) Alb, albúmina. Todas las moléculas se adicionaron en una concentración de 2mg/ml.

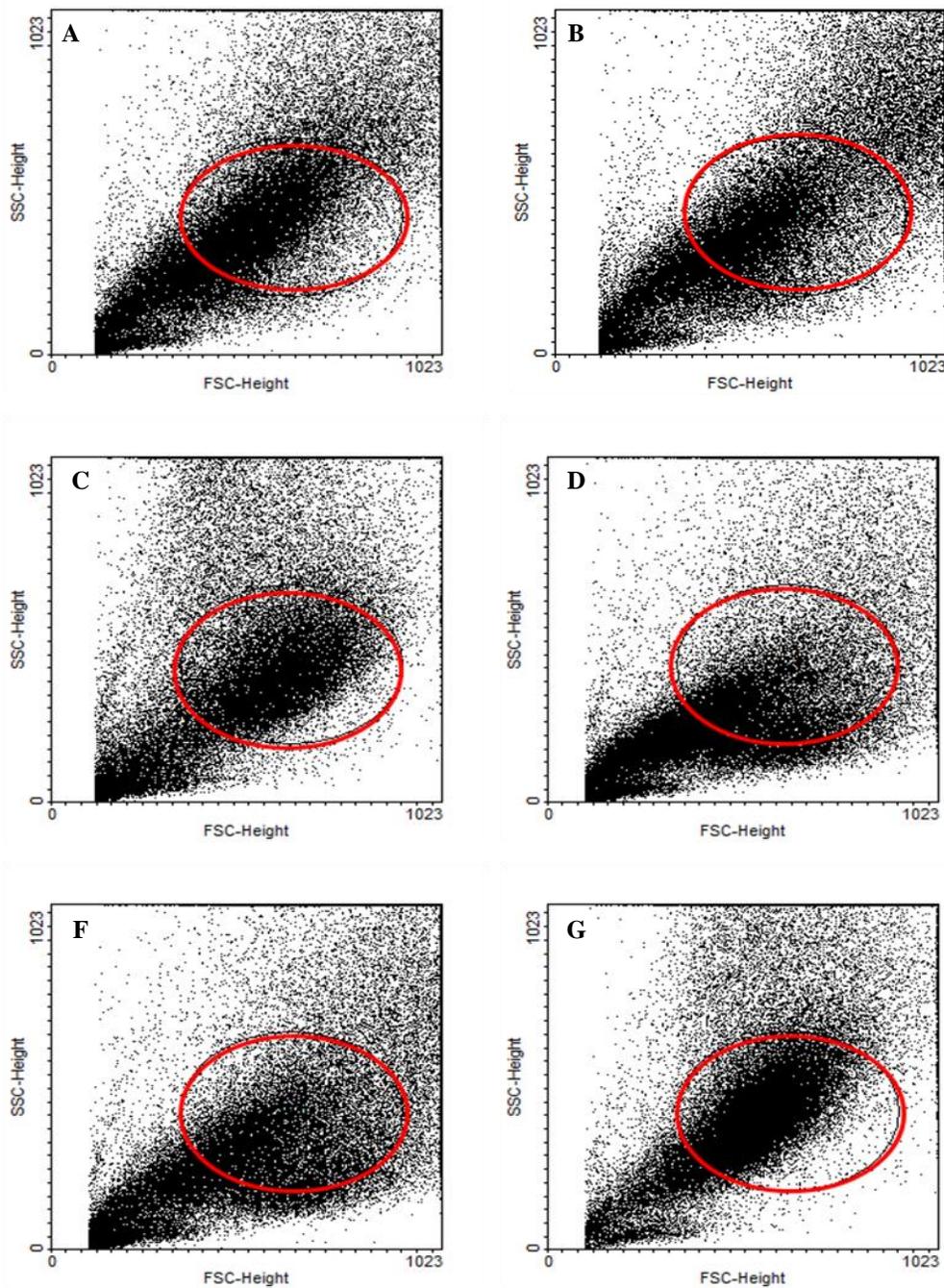


Figura 15. Región de macrófagos a partir de la granularidad (SSC) y tamaño (FSC) en cultivos de CMN de médula ósea de ratones BALB/c. A) rmIL-3, interleucina-3 recombinante de ratón; B) VEH, agua Milli-Q; C) CasNa, caseinato de sodio; D) TioNa, tioglicolato de sodio; E) HC, hidrolizado de caseína; F) Alb, albúmina. Todas las moléculas se adicionaron en una concentración de 2mg/ml.

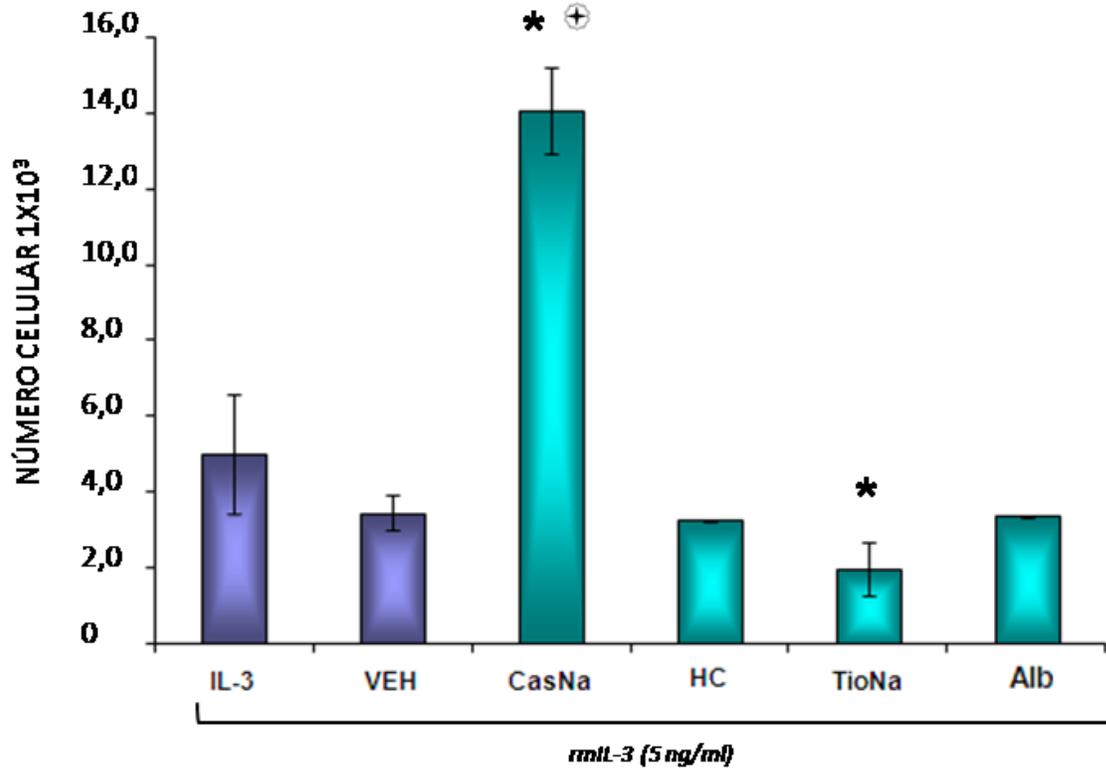


Figura 16. Número celular de la población positiva a Gr-1 en cultivos de CMN de médula ósea de ratones BALB/c. rml-3, Interleucina-3 recombinante de ratón; VEH, agua Milli-Q; CasNa, caseinato de sodio; HC, hidrolizado de caseína; TioNa, tioglicolato de sodio; Alb, albúmina. Todas las moléculas se adicionaron en una concentración de 2mg/ml. *^a Diferencia significativa con respecto a la rml-3 y VEH. *^b Diferencia significativa con respecto a las demás moléculas $p \leq 0.05$.

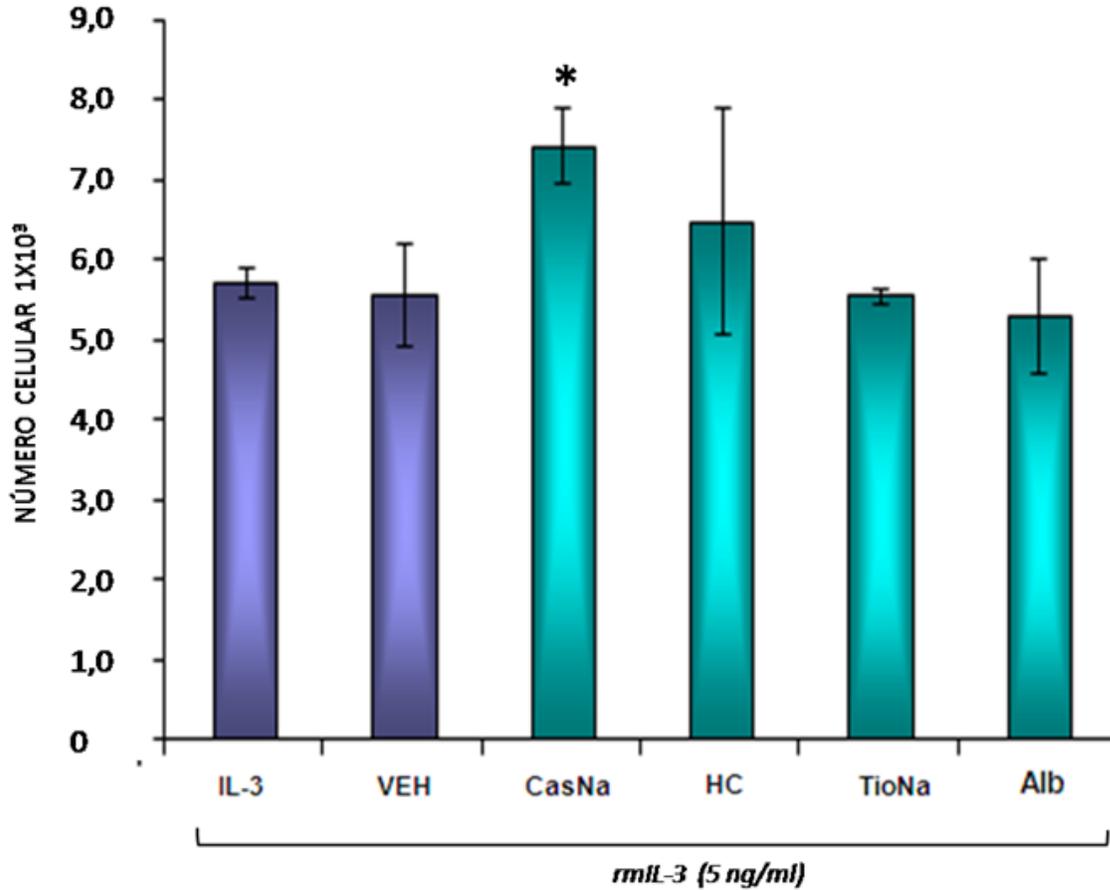


Figura 17. Número celular de la población positiva a CD11b en cultivos de CMN de médula ósea de ratones BALB/c. rmlL-3, Interleucina-3 recombinante de ratón; VEH, agua Milli Q; CasNa, caseinato de sodio; HC, hidrolizado de caseína; TioNa, tioglicolato de sodio; Alb, albúmina. Todas las moléculas se adicionaron en una concentración de 2mg/ml. *Diferencia significativa, con respecto al control y VEH $p \leq 0.05$.

Ratones tratados con CasNa presentan un mayor IM en células de médula ósea.

Una vez demostrado que el CasNa fue la única molécula proinflamatoria capaz de aumentar la proliferación de CMN *in vitro*, se procedió a evaluar si esta propiedad se conservaba *in vivo*. Ratones BALB/c fueron tratados vía intraperitoneal cada 48 horas por 6 días a diferentes concentraciones de CasNa, TioNa, HC y Alb. Se obtuvieron las células totales de médula ósea y se procedió a evaluar la proliferación mediante el parámetro del IM. Cuando se evaluó bajo el microscopio se observaron más células en división con el tratamiento de CasNa al 5 y 10% en comparación con las demás moléculas (**figura 18**). Al evaluar el porcentaje (%) del IM se observó un incremento significativo con CasNa y Alb en concentraciones de 5 y 10% con respecto al control y VEH, aunque el tratamiento con CasNa al 5 y 10% presentaron un incremento significativo en relación a la albúmina, mientras que el TioNa e HC no muestran efecto alguno en ninguna de las concentraciones utilizadas (**figura 19**).

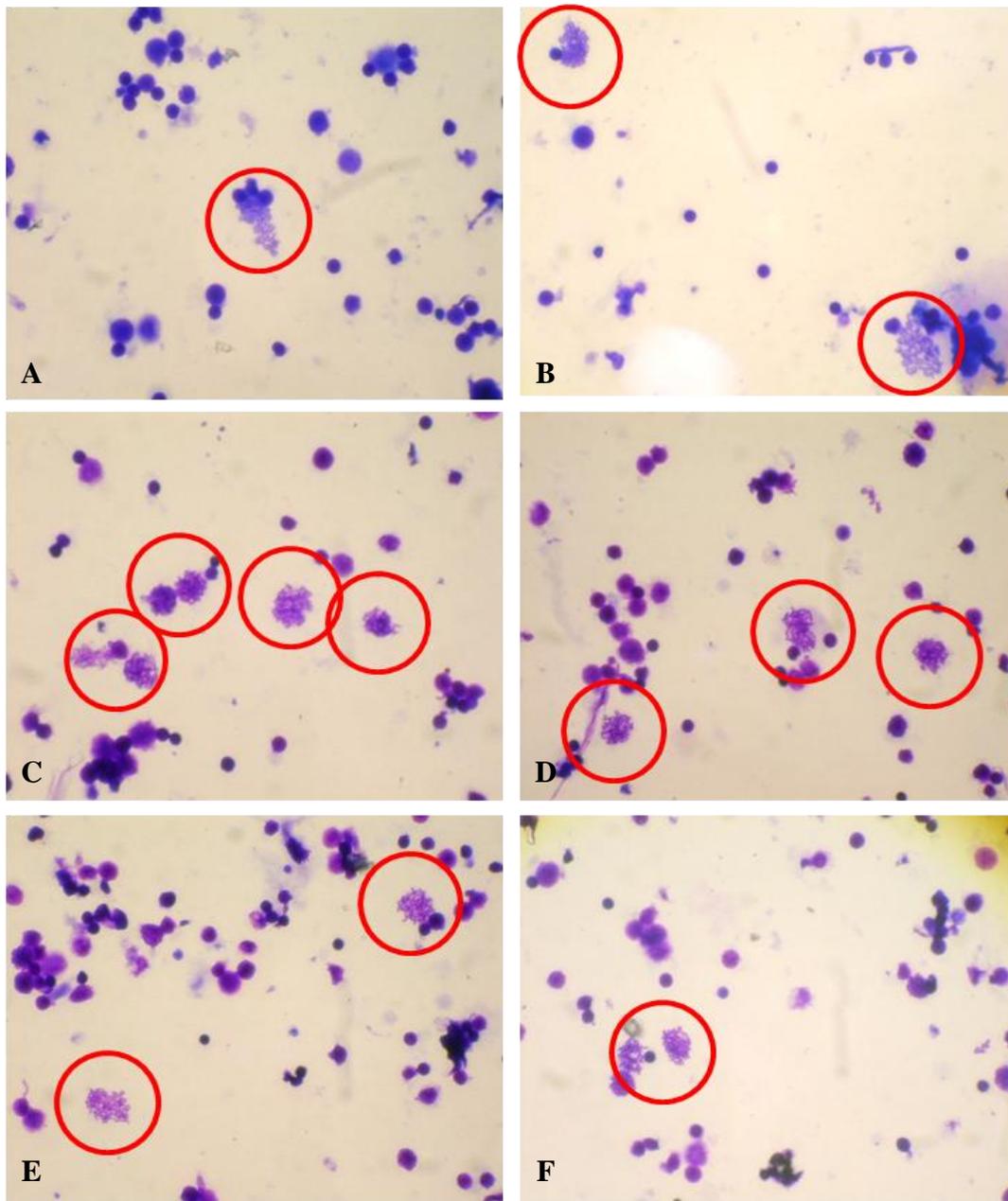


Figura 18. Células en división provenientes de médula ósea de ratones BALB/c. A) Control, ratones no tratados; B) VEH, solo agua Milli-Q; C) CasNa, caseinato de sodio al 10% p/v; D) CasNa al 5% p/v; E) Alb, albúmina al 10% p/v (la concentración al 5% es similar); F) TioNa, tioglicolato de sodio al 3% p/v. Las células en división se encuentran marcadas con un círculo.

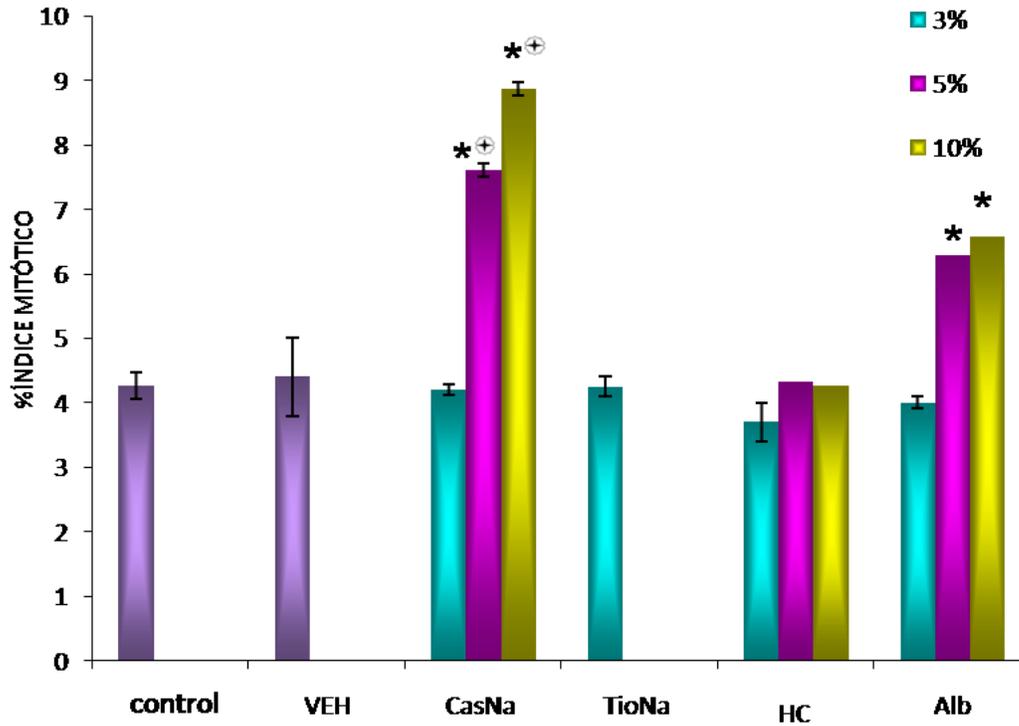


Figura 19. Índice mitótico en células totales de médula ósea provenientes de ratones BALB/c. Control, ratones no tratados; VEH, solo agua Milli-Q; CasNa, caseinato de sodio; TioNa, tioglicolato de sodio; HC, hidrolizado de caseína y Alb, albúmina. *Diferencia significativa, con respecto al control y VEH $p \leq 0.05$. ⊕ Diferencia significativa, con respecto a la Alb al 5 y 10% $p \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

La caseína, el CasNa, el TioNa y el HC son moléculas utilizadas en modelos de estudio de inflamación, ya que su administración induce una migración de granulocitos y macrófagos al sitio de la inyección^{72,73,80,81}. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que el CasNa, a pesar de ser un agente proinflamatorio, activa la hematopoyesis normal tanto *in vitro* como *in vivo*^{77,78}, sin embargo se desconoce si otros agentes proinflamatorios causen el mismo efecto sobre la hematopoyesis.

En este trabajo se muestra que el CasNa, el TioNa y el HC a las 16 h inducen migración de granulocitos a cavidad peritoneal, células proinflamatorias que se conoce son las primeras en llegar al sitio de inflamación^{47,48,49}, lo cual está dentro del rango de 3-24 horas después del estímulo^{82,83}. Es de resaltar que, nuestros datos también indican que el CasNa es la única molécula que promueve la migración de macrófagos, sino que ya lo hace desde las 16 h, a diferencia de lo reportado en la literatura cuyo incremento se da alrededor de las 92 h^{82,83,84}. El hecho de que el CasNa presente el mayor efecto sobre la migración no sólo de granulocitos sino también de macrófagos, dos poblaciones que integran una de las primeras barreras inmunológicas innatas^{84,85,86}, sugiere que podría tener una gran relevancia en la activación inmune en casos donde se requiera la optimización de una respuesta de defensa contra agentes patógenos. De hecho nuestros datos explican en parte la sobrevivencia de ratones inyectados con dosis letales de bacterias después de la administración de caseína, actividad de protección a cargo de los granulocitos⁸⁷, así se refuerza el papel de las caseínas como activadoras del sistema inmune natural, un mecanismo que se sugiere puede ser de utilidad para combatir agentes patógenos resistentes a los antibióticos⁸⁷.

Al evaluar si estas moléculas proinflamatorias inducen proliferación de células mieloides, se encontró que sólo el CasNa presentó un aumento significativo en la proliferación en comparación con las demás moléculas proinflamatorias, incluso con el TioNa y el HC se observa una disminución de la proliferación celular utilizando dos

técnicas de evaluación diferentes (figura 11 y 12). Estos resultados indican que no todas las moléculas proinflamatorias empleadas en este estudio tienen la capacidad de activar la hematopoyesis *in vitro*. La presencia de agregados de células en proliferación identificados como del linaje granulocítico y macrófago, así como el incremento en la expresión de marcadores específicos como Gr-1 o CD11b marcadores que son utilizados en la identificación de granulocitos y macrófagos respectivamente ^{48,88,89,90,91,92,93}, confirman que el CasNa, pero no el TioNa, el HC o la Alb, induce la proliferación de células de linaje granulocítico y macrófago. Cabe destacar que al evaluar el IM, cuyo incremento es evidencia de proliferación celular y un descenso indica citotoxicidad ^{94,95,96}, el CasNa induce un mayor incremento en el IM, seguido por Alb, mientras que TioNa o HC no tienen efecto (figura 18).

Los datos previos indican que el CasNa induce la proliferación de células mieloides *in vitro*, pero aún no se conoce *in vivo* el linaje mielóide involucrado. El hecho de que el CasNa promueva la proliferación de células pertenecientes al linaje granulocítico y macrófago *in vitro*, así como el incremento en suero de factores estimuladores de colonias como G-CSF, M-CSF y GM-CSF, citocinas específicas para la proliferación de granulocitos y macrófagos ^{72,73}, sugieren que las células que proliferaron *in vivo* probablemente pertenezcan al linaje granulocítico y macrófago, aunque también sería interesante observar si inducen proliferación de células del sistema inmune adaptativo como por ejemplo linfocitos T o B, hipótesis admisible-plausible ya que se conoce que la b-caseína induce la proliferación de ambos linajes celulares *in vitro* ⁹⁷. De confirmarse lo anterior se daría un indicio del potencial biomédico del CasNa optimizando la respuesta inmune innata y adaptativa

Es de llamar la atención que el HC, un producto de degradación enzimática de caseína y reconocido agente proinflamatorio ^{81,98}, al contrario del CasNa, inhibió la proliferación celular *in vitro*, mientras que *in vivo* no la alteró. Las razones que explican esta actividad biológica no se conocen, pero sugieren que se necesita la molécula

completa del CasNa para inducir tal efecto, hipótesis que debe ser sometida a prueba en un futuro.

En este trabajo se utilizó a la Alb como una proteína inocua, para nuestra sorpresa, promovió la migración de granulocitos, lo cual puede ser explicado por su capacidad de inducir la producción de óxido nítrico, un reconocido agente proinflamatorio⁹⁹. Por otro lado, su administración *in vivo*, aunque en menor medida que el CasNa, también incrementa el IM, efecto que no tiene precedente por lo que sería interesante evaluar con mayor profundidad sus propiedades proinflamatorias.

En este estudio mostramos que el CasNa activa la proliferación *in vitro* e *in vivo*, sin embargo se desconoce el mecanismo involucrado, aunque se sabe que en la médula ósea existe un microambiente propicio para sostener la proliferación de varios linajes celulares, modulado por múltiples citocinas con actividad promotora o inhibidora^{32,35,100}. Previos reportes muestran que la inyección del CasNa, vía intraperitoneal en ratones incrementa los niveles de G-CSF, M-CSF y GM-CSF en cavidad peritoneal e incluso en suero, citocinas que participan de manera positiva en la proliferación de las células hematopoyéticas, por lo que pensamos que probablemente la activación de la hematopoyesis se lleve a cabo vía producción de este tipo de citocinas, aunque en estudios posteriores se debería confirmar la presencia de estas y otras citocinas que influyan positivamente sobre la hematopoyesis bajo nuestras condiciones

En este trabajo el CasNa fue el único agente proinflamatorio capaz de regular la hematopoyesis normal de ratón tanto *in vitro* como *in vivo*. Este dato es interesante si se considera que nuestro grupo de trabajo ha mostrado que el CasNa inhibe la proliferación de las líneas celulares leucémicas de ratón como WEHI-3, J774 y P388^{67,76}. El hecho de que el CasNa por un lado frene la proliferación de líneas celulares leucémicas, pero estimule la proliferación de células hematopoyéticas normales, llama mucho la atención por lo que en un futuro el CasNa podría tener un papel importante como alternativa en la terapia contra problemas hemato-oncológicos.

CONCLUSIÓN

- Se corroboró que la inyección de CasNa, TioNa e HC induce acumulación de granulocitos en la cavidad peritoneal.
- La inyección de CasNa, en la cavidad peritoneal, induce un mayor aumento en el número de granulocitos y también macrófagos con respecto al TioNa, HC y la Alb.
- En este estudio el CasNa fue la única molécula proinflamatoria capaz de estimular *in vitro* la proliferación de CMN de médula ósea de ratones BALB/c.
- El CasNa induce *in vitro* la diferenciación de las CMN de médula ósea hacia el linaje granulocítico y macrofágico.
- El CasNa induce *in vivo* una mayor proliferación de células en médula ósea.
- El TioNa e HC, *in vitro e in vivo*, a pesar de ser agentes proinflamatorios no activan la hematopoyesis.

APÉNDICE

Preparación del CasNa, el TioNa, el HC y la Alb en concentraciones de 3, 5 y 10%.

Para preparar las moléculas al 3% se pesó 0.03g de cada molécula y se diluyeron en 1ml de agua Milli-Q.

Para obtener una concentración al 5% de cada una de las moléculas, se pesó 0.05 g diluidos en 1ml de agua Milli-Q

Para obtener la concentración al 10% se pesó 0.1 g para cada molécula, diluido en 1ml de agua Milli-Q.

Sin embargo en el caso de la Alb en cada una de las concentraciones se diluyeron en el doble de volumen de agua Milli-Q que las demás moléculas. Finalmente las moléculas se sometieron a un proceso de esterilización para ser inyectados en cavidad peritoneal a ratones BALB/c.

Preparación de glutaraldehído al 1%

A 1.57 ml de glutaraldehído se le agrega 98.43 ml de agua destilada (agua Milli-Q). La solución de glutaraldehído se conserva temperatura ambiente.

Preparación de la solución de cristal violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 Mm a 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 1g de cristal violeta y se afora a 500 ml con agua destilada (agua Milli-Q). Finalmente la solución se filtra usando papel Whatman número 2 y se almacena a temperatura ambiente.

Inactivación del suero fetal bovino

El suero fetal bovino (SFB) se descongeló a temperatura ambiente, posteriormente fue sometido a un calentamiento en baño maría a 57°C durante 30 minutos, con el propósito de inactivar las proteínas del complemento, se deja enfriar a temperatura ambiente y se mantiene a 4°C.

Preparación de IMDM

Se disuelve un sobre de Iscove (17.7g aproximadamente) (Gibco, USA) y bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 3.024g/L en un litro de agua desionizada (Agua Milli-Q). Una vez preparada la solución, ésta es filtrada mediante una membrana (tamaño de poro 0.22µm, diámetro 47mm; Millipore). Al término se adicionó el antibiótico 1ml/L (Penicilina-Estreptomicina) y el medio es mantenido a temperatura de 4°C hasta su uso.

Interleucina-3 recombinante murina (rmIL-3)

Se pesan 10mg de Alb y se disuelven en 10 ml de PBS. Enseguida la solución se filtra mediante una membrana (tamaño de poro 0.22µm, diámetro 25mm). Posteriormente se toman 100µl de interleucina y se diluyen en los 10 ml de la solución filtrada. Después se toman alícuotas de 1ml en eppendorf estériles, por último se refrigeran a -20°C.

Solución amortiguadora de fosfatos

Los componentes químicos que se usan para preparar 1000 ml de solución son los siguientes:

Cloruro de Sodio	8.0g
Cloruro de Potasio	0.2g

Fosfato monoácido de Sodio	2.16g
Fosfato diácido de Potasio	0.2g

Estas sales se diluyen en un volumen de 800 ml de agua Milli-Q por agitación. Posteriormente se afora a un volumen final de 1000 ml y esta solución se ajusta a un pH de 7.2 a 7.4, después se esteriliza en la autoclave por 15 min, finalmente es almacenada a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

LISTA DE ABREVIATURAS

Agua milli-Q	Agua desionizada
Alb	Albúmina
ATRA	Ácido all-transretinoico
CasNa	Caseinato de sodio
CFU	Unidad formadora de colonias
CFU-G	Unidad formadora de colonias granulocíticas
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulocitos-macrófagos
CFU-M	Unidad formadora de colonias mielocíticas
CMN	Células mononucleadas
CTH	Célula troncal hematopoyética
CTH-CP	Célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo
CTH-LP	Célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo
EPO	Eritropoyetina
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
HC	Hidrolizado de caseína
IL	Interleucina
IM	Índice mitótico
IMDM	Medio Iscove modificado de Dulbecco
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltones
Lin	Linaje
LPS	Lipopolisacarido
M	Molaridad
MH	Microambiente hematopoyético

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ml	Mililitro
NK	Célula asesina natural
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PEM	Progenitor eritroide-megacariocítico
PLC	Progenitor linfoide común
PMC	Progenitor mieloide común
PMP	Progenitor multipotente
rmIL-3	Interleucina-3 recombinante de ratón
rpm	Revoluciones por minuto
SE	Suero equino
SFB	Suero fetal bovino
TioNa	Tioglicolato de sodio
TPO	Trombopoyetina
VEH	Vehículo

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Renstrom J, Kroger M, Peschel C y Oostendorp R. (2010). How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chemic Biol Interac.* 184: 7-15.
2. Beletiz G y Beletiz D. (1997). *Food chemistry*. Segunda Edición. Serinquer. Alemania. 470-482.
3. Zambrano IR, Santiago E, Weiss B y Cáceres JR. (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev Invest Clin.* 52: 53-66.
4. Bellantuono I. (2004). Hematopoietic stem cell. *Int J Biochem. Cell Biol.* 36: 607-620.
5. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P y Chávez-González A. (2007). Hematopoyesis. *Cancerología.* 2: 97-107.
6. Roob L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene.* 26: 6717- 6723.
7. Ramírez OM y Cornejo GAM. (2004). Fisiología de la Hematopoyesis. *Pediatr. Integral.* 8: 377-382.
8. Alvarado-Moreno JA y Mayani H. (2007). El ciclo celular y su papel en la Biología de las células progenitoras hematopoyéticas. *Gac Méd Méx.* 143: 149-161.
9. Szilvassy J y Stephen. (2003). The Biology of Hematopoietic Stem Cells. *Arch Med Res.* 34: 446-460.

10. Orkin HS y Zon IL. (2008). Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 132: 631-644.
11. Tong Y y Linheng L. (2006). The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 116: 1105-1111.
12. Osawa M, Hanada K, Hamada H y Nakauchi H. (1996). Long-term Lymphohematopoietic reconstitution by single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 273: 242-245.
13. Zhao Y, Lin Y, Yang G, Louie J, Harrison DE y Anderson WF. (2000). Murine hematopoietic stem cell characterization and its regulation in BM transplantation. *Blood*. 96: 3016-3022.
14. Wilson A y Trumpp A. (2006). Bone-marrow hematopoietic stem-cell niches. *Immunol*. 6: 93-106.
15. Rosmarin AG, Yang Z y Resendes KK. (2005). Transcriptional regulation in myelopoiesis: hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol*. 33: 131-143.
16. Kondo M, Weissman IL y Akashi K. (1997). Identification of clonogenic lymphoid progenitor in mouse bone marrow. *Cell*. 91: 661-672.
17. Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D y Weissman IL. (2000). Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol*. 12: 144-150.
18. Larson J y Karlsson S. (2005). The role signaling in hematopoiesis. *Oncogene*. 24: 5676-5692.
19. McKenzie SB. (1991). Hematología clínica. Ed. Manual Mod Méx. 523.

20. Medvinsky AI, Samoylina NL, Muller AM y Dzierzak EA. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S: in the developing mouse. *Nature*. 364: 64-67.
21. Takeuchi M, Sekiguchi T, Hara T, Kinoshita y Miyajima A. (2002). Cultivation of aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cell in the fetal liver microenvironment amplifies long-term. Repopulation activity and enhances engraftment to the bone marrow. *Blood*. 99: 1190-1996.
22. Baron MH. (2003). Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. *Exp Hematol*. 31: 1160-1169.
23. McGrath KE y Palis J. (2005). Hematopoietic in the yolk sac: more meets the eyes. *Exp Hematol*. 33: 1021-1028.
24. Medvisky y Dzierzak. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 86: 897-906.
25. Cumano A y Godin I. (2001). Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Curr Opin Immunol*. 13: 166-171.
26. Godin I y Cumano A. (2005). Of the birds and mice: hematopoietic stem cell development. *Int J Dev Biol*. 49: 251-257.
27. Dierzak E y Speck N. (2008). Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*. 2: 129-136.
28. Hughes-Jones NC y Wickramasinghe E. (1991). *Lecture notes on haematology*. Blackwell Scien Publicat, London. 225.

29. Mera C, Roa A y Ramírez S. (2007). Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. *Rev Cienc Salud*. 5: 67-89.
30. Metcalf D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood*. 111: 484-490.
31. Aguirre AM, Quintana R y Brandan N. (2002). Citocinas. *Cated Bioquím. UNNE*: 1-19.
32. Lotem J y Sachs L. (2002). Cytokine control of developmental programs in normal hematopoietic and leukemia. *Oncogene*. 21: 3284-3294.
33. Hibi M y Hirano T. (1998). Signal transduction through cytokine receptor. *Int Rev Immunol*. 17: 75-105.
34. O'Shea JJ, Gadina M y Schreiber RD. (2002). Cytokine signaling in. *New surprises in the Jak/Stat pathway*. *Cell*. 109: S121-S131.
35. Baker SJ, Rane SG y Reddy EP. (2007). Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 26: 6724-6737.
36. Kaushansky K. (2006). Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl Med*. 354: 2034-2045.
37. Kishimoto T, Tago T y Akira S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell*. 76: 253-262.
38. Ihle JN. (1995). Cytokine receptor; signaling. *Nature*. 377: 591-594.
39. Taniguchi T. (1995). Cytokine signaling through non-receptor protein tyrosine kinases. *Science*. 268: 251-255.

40. Medzhitov R y Janeway C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol.* 173: 89-97.
41. Smith CL, Clow AL y Terwilliger PD. (2001). The ancestral complement system in sea urchins. *Immunol.* 180: 16-34.
42. Stanley M. (2006). Immune response to human papillomavirus. *Vaccine.* 26: S1/16-S1/22.
43. Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature.* 420: 846-852.
44. García BP. (2008). Inflamación. *Rev Acad Cienc Exact Fis Nat.* 102: 91-159.
45. Barton MG. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest.* 118: 413-420.
46. Medzhitov R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449: 819-826.
47. Pham TNC. (2006). Neutrophil serine proteases; specific regulators of inflammation. *Immunol.* 6: 541-550.
48. Haitan L. (2006). Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol Cancer Res.* 4: 1-13.
49. Ueda Y, Kondo M y Kelsoe G. (2008). Inflammation and the reciprocal production de granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med.* 210: 1771-1780.
50. Ferguson K y Brown L. (1996). Bacteremia and sepsis. *Emerg Med Nosth Am.* 14: 95-185.

51. Pergamo G. (1997). Sobre la localización de la enfermedades. Ed. Gredos S A. Madrid. pp 248.
52. Bainton DF, Ullyot JL y Farguhar MG. (1971). The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med.* 134: 907-934.
53. Rangel F, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis C y Wenzel R. (1995). The natural history of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA.* 273: 23-117.
54. Akira S, Uematsu S y Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124: 783-801.
55. Gordon S y Taylor PR. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5: 953-964.
56. Mosser MD y Edwards PY. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8: 958-969.
57. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucoutuner P, Littman DR, Cumano A y Geissman F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cell. *Science.* 311: 83-87.
58. Tacke F y Randolph GJ. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiol.* 211: 609-618.
59. Zhang X y Mosser DM. (2008). Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol.* 214: 161-178.
60. Rosenthal AS. (1980). Regulation of the immune response: role the macrophage. *N Engl Med.* 303: 1153-1156.

61. Geske FJ, Monks J, Lehman L y Fadok VA. (2002). The role of the macrophage in apoptosis; helper, gatherer and regulator. *Int J Hematol.* 76: 16-26.
62. David CD, Laurence B y W Corrad L. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 112: 035-945.
63. Geissmann F, Jung S y Littman DR. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19: 71-82.
64. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA y Leenen PJM. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol.* 172: 4410-4417.
65. Qu CF, Edwards EW, Tacke F, Angeli V, Llodra J, Sanchez-Schmitz G, Garin A, Haque NS, Peters W, Van RN, Sanchez-Torres C, Bromberg J, Charo IF, Jung S, Lira SA y Randolph GJ. (2004). Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cell to lymph nodes. *J Exp Med.* 200: 1231-1241.
66. Fenaux P, Chomienne C y Degos L. (2001). All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocyte leukemia. *Semin Hematol.* 38: 13-25.
67. Ramos G, Weiss B, Melo B, Córdova Y, Ledesma E, Muñoz L, Sánchez L, García A y Santiago Osorio E. (2008). Alpha, beta, kappa caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32 D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiol.* 213: 131-141.
68. Miesel H. (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers.* 43: 119-128.

69. Marchin S, Pataux J, Pignon F y Loonil J. (2007). Effects is the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo thransmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering. *J Chem. Phys.* 126: 1-10.
70. Charaborty A y Basak S. (2007). pH – induced structural transitions of caseins. *J Photochem Photobiol Biol.* 87: 191-199.
71. Walstra P y Jenner R. (1984). *Dairy chemistry and physics*. Ed. Jhon Wiley Sons. New York, USA. 106.
72. Metcalf D, Roob L, Dunn AR, Mifsud S y Di RL. (1996). Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and colony-stimulating granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood.* 88: 3755-3764.
73. Lotem J y Sanchs L. (1985). Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation including proteins in vivo: regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer.* 35: 93-100.
74. Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S y Frigo G. (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Rev EurSci Med Farmacol.* 2: 71-81.
75. Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B y Weiss B. (2000). El caseínato de sodio (CasNa) induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Invest Clin.* 52: 638-644.
76. Aguíñiga I. (2008). Estudio del efecto del caseínato de sodio (CasNa) sobre la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mieloides J774 y P388 de ratón. Tesis de licenciatura FES-Zaragoza UNAM

77. Santiago OE, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Martinez I, Ramos MG, Aguiñiga I. (2010). Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiol.* 215: 332-339.
78. Lagunes SHE, Ramos MG, Galván QA, Ledesma ME, Weiss SB y Santiago OE. (2001). Efecto del CasNa en la proliferación y viabilidad de células leucémicas y células mononucleadas de médula ósea. *Rev Biomed.* :12-21.
79. Silvestre O. (2007). La inyección del CasNa en ratones BALB/c induce la proliferación de células de médula ósea del linaje mieloide y linfoides. Tesis de licenciatura FES-Zaragoza UNAM.
80. Shamay 2003
81. Siedman AM, Chew WT, Schenkel RA y Muller AW. (2009). PECAM Independent thioglycollate peritonitis is associated with a locus murine Chromosome. *PLOS ONE.* 4: 1-8.
82. Mullner N, Lázár A y Hrabák A. (2002). Enhanced utilization and altered metabolism of arginine in inflammatory macrophages caused by raised nitric oxide synthesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 1080-1090.
83. Gong Y, Erika H, Shcurin A y Huorer JK. (2008). Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest.* 118: 3012-3024.
84. Brions E; Colino CI; Millán CG; Lanao JM. (2009). Increasing the selectivity of amikacin in rat peritoneal macrophages using carrier erythrocytes. *Eur J Pharma Sci.* 38: 320-324.

85. Kazlauskaitė J, Biziulevičius GA, Zukaite V, Biziuleviciene G, Miliukiene V Y Siaurys A. (2005). Oral tryptic casein hydrolysate enhances phagocytosis by mouse peritoneal and blood phagocytic cells but fails to prevent induced inflammation. *Int Immunopharmacol.* 5: 1936-1944.
86. Kobayashi SD, Viyich JM y DeLeo FR. (2005). Neutrophilia in the innate immune response. 6: 505-517.
87. Noursadeghi M, Birkerstaff MCM, Herbert J, Moyes D, Cohen J y Pepys MB. (2002). Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J Immunol.* 169: 913-919.
88. Fleming TJ, Fleming ML y Malek TR. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol.* 151: 2399-2408.
89. Springer TA. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346: 425-434.
90. Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y, Shiga S, Tohyama K, Ichayama S, Wang F y Houwen B. (2000). Flow Cytometric Method for Enumeration and classification of Reactive Immature Granulocyte Population. *Cytometry.* 42: 371-378.
91. Kawai K, MD, Tsuno NH, MD, Matsuhashi M, Kitayama Joji, MD, Takuya Osada, MD, Jun Yamada, MD, Tsuchiya T, MD, Yoneyama S, MD, Watanabe T, MD, Takahashi K, MD y Nagawa H. (2005). CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells. *J Allergy Clin Immunol.* 116: 192-197.

92. Narita Y, Wakita D, Ohkurt T, Chamoto K y Nishimura T. (2009). Potential differentiation of tumor bearing mouse CD11b+Gr-1+ immature myeloid cells into both suppressor macrophages and immunostimulatory dendritic cells. *Biomed Res.* 30: 7-15.
93. Yung WJ, Carlene LZ, Jen-Feng L, Casey TW y David DC. (2009). MMP induced by Gr-1 cell are crucial for recruitment of the cells into the airways. *E J immunol.* 39: 2281-2292.
94. Calderón-Segura ME y Espinosa RM. (1998). Efecto de butilate y de molinate sobre la división de los linfocitos humanos en cultivo con y sin activación metabólica in vivo e in vitro por *vicia faba*. *Rev Int Contam Ambient.* 14: 39-47.
95. Lucas AG, Aguirre MV, Aquino EJ, Gualberto R y Brandan N. (2005). Análisis diferencial de celularidad, viabilidad, apoptosis y mitosis en médula ósea murina tratada con diferentes dosis de Etopósido. *Cated Bioquím.* M-058
96. Marquez C. (2005). Micronucleos e índice mitótico en branquias de mejillón *Mytilus californianus* (CONRAD 1837) expuestos a petróleo. *Rev Int Contam Amb.* 21: 43-48.
97. Wong WC, Seow FH, Liu HA, Husband JA, Smithers GW y Watson Dennis. (1999). Modulation of immune responses by bovine β -casein. 74: 323-329.
98. Mao XY, Yang HY, Song JP, Li YH y Ren FZ. (2007) Effect of yak milk casein hydrolysate on Th1/Th2 cytokines production by murine spleen lymphocytes in vitro. *J Agric Food Chem.* 55: 638-642.
99. Poteser M y Wakabayashi. (2004). Serum Albumin induces iNOS expression and NO production in Raw 263-4 macrophages. *British J Pharmacol.* 143: 143-151.

100. Zhu J y G Emerson S. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*. 21: 3295-3313.

101. Montesisno JJ y Mayani Hector. (2002). Nuevos conceptos en la biología de la leucemia mieloide aguda. *Gad Méd Méx*. 1: 67-77.

102. Tirado-Gómez LL y Mohar BA. (2007). Epidemiología de las neoplasias hemato-oncológicas. *Cancerología*. 2: 109-120.