



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-ZARAGOZA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CASEINATO DE SODIO
(CasNa) SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA MIELOPOYESIS Y
LINFOPOYESIS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. EN C. VANIHAMÍN DOMÍNGUEZ MELÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
FES-ZARAGOZA UNAM.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL: Dra. LETICIA MORENO FIERROS
FES-IZTACALA UNAM.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL: Dr. ENRIQUE I. MIRANDA PERALTA
FACULTAD DE MEDICINA UNAM.

MEXICO, D.F

DICIEMBRE 2012



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-ZARAGOZA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CASEINATO DE SODIO
(CasNa) SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA MIELOPOYESIS Y
LINFOPOYESIS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. EN C. VANIHAMÍN DOMÍNGUEZ MELÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
FES-ZARAGOZA UNAM.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL: Dra. LETICIA MORENO FIERROS
FES-IZTACALA UNAM.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL: Dr. ENRIQUE I. MIRANDA PERALTA
FACULTAD DE MEDICINA UNAM.

MEXICO, D.F

DICIEMBRE 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de Septiembre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del (la) alumno (a) **VANIHAMIN DOMÍNGUEZ MELÉNDEZ** con número de cuenta **504008254** con la tesis titulada: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CASEINATO DE SODIO (CASNA) SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA MIELOPOYESIS Y LINFOPOYESIS", realizada bajo la dirección del **DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**:

Presidente: DR. BENNY WEISS STEIDER
Vocal: DRA. ROSSANA PELAYO CAMACHO
Secretario: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 8 de Noviembre de 2012.

María del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto es un resultado más del esfuerzo del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la UNAM, para crear futuros investigadores que contribuyan al desarrollo del país. A el y a su cuerpo administrativo, Gracias.

Durante la realización del presente trabajo de investigación se contó con el apoyo del Programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 183160.

La realización de la investigación fue apoyada también por el proyecto PAPIIT IN 214903-2 de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA).

Al Dr. Edelmiro Santiago, agradezco el apoyo prestado para la realización de mis estudios de posgrado en su laboratorio.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros, agradezco su infinita paciencia para enseñarme a trabajar de mejor manera, por dirigirme cuando siempre se prestó la ocasión, y por sus consejos siempre oportunos durante todo el trayecto de mi doctorado así como ah su peculiar manera para exigir mas de mi para aumentar la calidad de mi trabajo y persona. Por todo eso y más, mil gracias.

Al Dr. Enrique Miranda, por sus consejos y apoyo para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

| TEMA | PÁGINA |
|---|--------|
| ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| • Hematopoyesis y células troncales hematopoyéticas | 9 |
| • Linfopoyesis y mielopoyesis | 15 |
| • Mielopoyesis | 15 |
| • Linfopoyesis | 16 |
| • Microambiente hematopoyético. | 17 |
| • Hematopoyesis esplénica | 20 |
| • Citocinas y receptores de citocinas | 21 |
| • Transducción de señales de las citocinas | 26 |
| • Biomoléculas activadoras de hematopoyesis | 29 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 32 |
| HIPÓTESIS | 33 |
| OBJETIVO | 34 |

| | |
|--|----|
| MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| RESULTADOS | 41 |
| • Efecto del CasNa en las células mononucleadas de médula ósea, bazo y timo | 41 |
| • Efecto del CasNa en la mielopoyesis | 45 |
| • Efecto del CasNa en la linfopoyesis | 63 |
| DISCUSIÓN | 69 |
| CONCLUSIÓN | 74 |
| BIBLIOGRAFÍA | 76 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Cascada hematopoyética.
- Figura 2: Microambiente Hematopoyético.
- Figura 3: Estructura de los receptores de las citocinas hematopoyéticas.
- Figura 4: Clasificación de receptores de citocinas hematopoyéticas.
- Figura 5: Conteo de células mononucleadas y viabilidad en M.O. Bazo y Timo.
- Figura 6: Células mononucleadas/BrdU en médula ósea.
- Figura 7: Morfología de células de médula ósea.
- Figura 8: Células Ly-6G/BrdU en médula ósea.
- Figura 9: Índice fagocítico de granulocitos.
- Figura 10: Células CD11b/BrdU en cavidad peritoneal.
- Figura 11: Índice fagocítico de monocitos.
- Figura 12: Células CD11b/BrdU en cavidad peritoneal.
- Figura 13: Células TER119/BrdU en médula ósea.
- Figura 14: Células CD41/BrdU en médula ósea
- Figura 15: Células B220/BrdU en médula ósea.
- Figura 16: Células B220/BrdU en Bazo.
- Figura 17: Activación de linfocitos por CasNa.
- Figura 18: Mecanismo de acción del CasNa.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGM: Zona aorta-gónada-mesonefros.
- ATRA: Ácido all-trans retinoico, del inglés *All-Trans Retinoic Acid*.
- BFU-e: Unidad bursa eritroide, del inglés *Burst Forming Unit erythroid*.
- BFS: Suero fetal bovino, del inglés *Bovine Fetal Serum*.
- BrdU: Bromodeoxiuridina.
- CasNa: Caseinato de sódio.
- CMN: Células mononucleadas.
- CLP: Progenitor linfoide común, del inglés *Commun Lymphoid Progenitor*.
- CMP: Progenitor mieloide común, del inglés *Commun Myeloid Progenitor*.
- CFU-GEMM: Unidad formadora de colonias mixta de granulocitos, eritrocitos monocitos y megacariocitos, del inglés *Colony Forming Unit Granulocytic, Erythroid, Monocyte and Megakaryocyte*.
- CFU-MkE: Unidad formadora de colonias megacariocitas y eritroides del inglés *Colony Forming Unit-Megakaryocytes and Erythroid*.
- CFU-GM: Unidad formadoras de colonias granulocito-macrófago, del inglés *Colony Forming Unit Granulocytes and Macrophages*.
- Células NK: Células asesinas naturales.
- CFU: Unidad formadora de colonias, del inglés *Colony Forming Unit*.
- ELP: Progenitor linfoide temprano, del inglés *Early Lymphoid Progenitor*.
- EPO: Eritropoyetina.
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína, del inglés *Fluoresceine Isotiocianate*.

G-CSF: Factor estimulador de colonias granulocíticas, del inglés *Granulocyte Colony Stimulating Factors*.

GM-CSF: Factor estimulador de colonias granulo-monocito, del inglés *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*.

HSC: Célula troncal hematopoyética, del inglés *Hematopoietic Stem Cell*.

IL: Interleucina, del inglés *Interleukin*.

IL-7R α : Receptor de la interleucina 7, del inglés *interleukin 7 alpha Receptor*.

IF: Índice fagocítico.

IP: Intraperitoneal.

IFN- γ : Interferón gamma.

JAK: Tirosina janus cinasa, del inglés *Janus kinase tyrosine*.

LB: Linfocito B.

LDP: Linfocito doble positivo.

LIF: Factor inhibidor de leucemia, del inglés *Leukemia Inhibitor Factor*.

LMPP: Progenitor multipotencial predisuesto al linaje linfoide, del inglés *Lymphoid Multipotent Primed Progenitor*.

LSP: Linfocito unipositivo; LT.

LT-HSC: Célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo, del inglés *Long Term Hematopoietic Stem Cell*.

LT: Linfocito T.

ST-HSC: Célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo, del inglés *Short Term Hematopoietic Stem Cell*.

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos, del inglés *Macrophage Colony Stimulating Factor*.

M-CSFR: Receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos, del inglés *Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor*.

MPP: Progenitor multipotencial, del inglés *Multi-Potent Progenitor*.

MIP-1 α : Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa, del inglés *Macrophage Inflammatory Protein*.

NK: Célula asesina natural, del inglés *Natural Killer*.

PBS: Solución estabilizadora de fosfatos.

Pre-NK: Precursor de NK.

Pre-pro B: Precursor de células pro B.

Pro-Btm: Célula pro B temprana.

Pro Btr: Célula pro B tardío.

Pre-B: Célula pre B.

Pre-pro T: Célula precursora pro T.

Pro T: Célula pro T.

SCF: Factor estimulador de células troncales, del inglés *Stem Cell Factor*.

STAT: Señal transductora de activación de tirocinas, del inglés *Signal Transducer Activator Transcription*.

TCR: Receptor de células T, del inglés *T Cell Receptor*.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*.

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral beta, del inglés *Tumor Growth Factor beta*.

TPO: Trombopoyetina.

RESUMEN

El evento que da origen a las células sanguíneas maduras a partir de una célula troncal hematopoyética es conocido como hematopoyesis. Este evento se lleva a cabo en el microambiente de la médula ósea en la etapa adulta del individuo y es regulado por una serie de glicoproteínas denominadas citocinas las cuales, tienen la capacidad de controlar la sobrevivencia, diferenciación, migración y hasta la muerte de las células sanguíneas. Sin embargo, existe evidencia de que la hematopoyesis puede ser regulada por biomoléculas diferentes a las citocinas, tal es el caso del ácido retinoico, la vitamina E, y la caseína que es la principal proteína de la leche así como su sal el caseinato de sodio (CasNa).

Existen estudios previos donde se ha observado que la inoculación de caseína y CasNa vía intraperitoneal en ratón aumenta las concentraciones en suero de citocinas involucradas en la mielopoyesis como son el GM-CSF, M-CSF y G-CSF. Estudios *in vitro* también han reportado que la caseína era capaz de inducir proliferación de linfocitos B y T. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha revelado que el CasNa es capaz de inducir la diferenciación de la línea celular hematopoyética de ratón 32D hacia el linaje monocito-macrófago, además de inducir la síntesis del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y su receptor (M-CSFR) *in vitro*. También se ha visto que el CasNa es capaz de acelerar la conversión de neutrófilos normales en banda a segmentados y de aumentar el número de células mononucleadas provenientes de médula ósea de ratones Balb/c *in vivo*. Esta serie de evidencias *in vitro* sugieren que el CasNa pudiese tener efectos sobre la hematopoyesis en un modelo *in vivo*. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluó el efecto *in vivo* del CasNa sobre la hematopoyesis mieloide y linfoide en ratones.

Los resultados obtenidos indican que, tras la inyección intraperitoneal de CasNa se induce primero un aumento en el número de células mononucleadas totales tanto en médula ósea, bazo y timo. Posteriormente observamos mediante el uso de marcadores específicos de linaje y de citometría de flujo que el CasNa induce

un incremento en la proliferación del linaje granulocítico principalmente y monocítico en médula ósea, mientras que por otro, el tratamiento también incrementa la incorporación de BrdU en el linaje linfoide B, en bazo primordialmente. Nuestros resultados también demuestran que el CasNa no sólo aumenta la proliferación de estos linajes celulares, sino que induce un incremento en la concentración de citocinas involucradas en la mielopoyesis y linfopoyesis como son: GM-CSF, el M-CSF, G-CSF, TPO, EPO, IL-2, IL-7 e IL-15. Por último encontramos, que el CasNa es capaz de aumentar también el índice fagocítico en medula ósea tanto de granulocitos como de monocitos.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran por primera vez de manera contundente que el CasNa es capaz de inducir la proliferación de células del linaje mieloide y linfoide, y que este evento se ve acompañado de un incremento en la concentración de citocinas clave que participan tanto en la mielopoyesis como en la linfopoyesis, además de activar células fagocíticas en médula ósea como granulocitos y monocitos.

ABSTRACT

The event that gives rise to mature blood cells from hematopoietic stem cell is known as hematopoiesis. This event takes place in the microenvironment of the bone marrow in the adult stage of the individual and is regulated by a series of glycoproteins called cytokines which have the ability to control the survival, differentiation, migration and death of blood cells. Nevertheless there is evidence that hematopoiesis can also be regulated by other biomolecules than cytokines such as retinoic acid, vitamin E, the main milk protein casein and sodium caseinate (CasNa). Previous studies have shown that intraperitoneal inoculation of casein and CasNa in mice increases in serum the concentration of cytokines involved in myelopoiesis such as GM-CSF, M-CSF and G-CSF. *In vitro* studies have shown that CasNa is capable to induce the differentiation of the mouse hematopoietic cell line 32D into the monocyte-macrophage lineage and the synthesis of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and its receptor (MCSF-R). Furthermore, CasNa is also capable to increase the conversion of normal neutrophil band cells into segmented ones and the number of mononuclear cells in the bone marrow of Balb/c mice *in vivo*. It has also been published that casein is able to induce the proliferation of B and T lymphocytes *in vitro*. These pieces of evidence lead us to believe that CasNa could influence hematopoiesis in an *in vivo* model. Therefore, in the present study we evaluated the possible *in vivo* effect of CasNa on myeloid and lymphoid hematopoiesis. Our results indicate that after intraperitoneal injection of CasNa there is an increase in the number of mononuclear total cells in bone marrow, spleen and thymus. By using lineage-specific markers and flow cytometry we observed that CasNa increased the proliferation of both the granulocytic and monocytic lineage in bone marrow, and BrdU incorporation by B lymphoid lineage cells in spleen. Our results also show that CasNa not only increases the proliferation of these cell lines, but also produced an increase in the concentration of cytokines involved in myelopoiesis and lymphopoiesis such as: GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TPO, EPO, IL-2, IL-7 and IL-15. Moreover our results also show the

induction of the phagocytic index in both bone marrow granulocytes and monocytes.

The results obtained in this study demonstrate for the first time unequivocally that *in vivo* the CasNa is able to induce proliferation of myeloid and lymphoid lineage cells, and that this event is accompanied by an increase in the concentration of key cytokines involved in both myelopoiesis and lymphopoiesis in addition to activate phagocytic cells in bone marrow as granulocytes and monocytes cells.

INTRODUCCIÓN

Hematopoyesis y células troncales hematopoyéticas

Día a día el organismo debe reemplazar billones de células sanguíneas maduras para su correcto funcionamiento, ya sea para que este lleve a cabo el transporte de oxígeno, algún evento de coagulación, o bien la defensa del organismo (Bellantuono, 2004). El reemplazo diario de eritrocitos, plaquetas y leucocitos es controlado por un mecanismo altamente regulado denominado hematopoyesis (Oberlin, 2010; Bellantuono, 2004; Szilvassy, 1995), este proceso se lleva a cabo en la medula ósea en la etapa adulta del individuo (Oberlin 2010; Mayani, 2007). La hematopoyesis se ha podido esquematizar en forma de cascada, en donde las células troncales hematopoyéticas (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cell*) encabezan dicha cascada (Mayani, 2007; Bellantuono, 2004; Szilvassy, 1995). Estas células pueden dividirse principalmente en dos; en primer lugar están las células troncales hematopoyéticas a largo plazo (LT-HSC, del inglés *Long Term Hematopoietic Stem Cells*), las cuales tienen la capacidad de autoperpetuarse continuamente *in vitro* y son las que dan origen a todas las células sanguíneas maduras y además tienen la capacidad de poder reconstituir la hematopoyesis en ratones irradiados (Mayani, 2007; Szilvassy, 1995). En segundo lugar están las células troncales hematopoyéticas a corto plazo (ST-HSC, del inglés *Short Term Hematopoietic Stem Cells*) que son derivadas de las LT-HSC pero que reducen su capacidad de autoperpetuarse por tiempo indefinido y son las que dan origen a los progenitores multipotenciales (MPP, del inglés *Multi-Potent Progenitor*), los cuales tienen como característica, el perder la capacidad de autorenovación, pero a cambio ganan un alto grado de proliferación y diferenciación (Metcalf ,2008). A partir de estos progenitores multipotenciales se derivan los progenitores que se comprometen ya sea hacia el linaje linfóide (CLP, del inglés *Commun Lymphoid Progenitor*) que darán origen a los linfocitos T, B y NK (Baba, 2004; Kondo 2001) y por otro lado están los progenitores mieloides comunes (CMP, del inglés *Commun Myeloid Progenitor*), de los que se derivaran los granulocitos, los monocitos, así

como los megacariocitos y los eritrocitos (Metcalf ,2008). En cuanto al origen de las células dendríticas se ha observado que estas pueden ser derivadas tanto de los progenitores linfoides comunes como de los progenitores mieloides (Mayani, 2007) (Figura 1).

De los CLP y los CMP se originan las etapas celulares intermedias, que son los precursores y las células hematopoyéticas maduras del torrente sanguíneo (Mayani, 2007). Por ejemplo los CMP pueden originar las unidades formadoras de colonia (CFU, del inglés *Colony Forming Unit*) que pueden ser multipotentes como la CFU de colonias mixta (CFU-GEMM, del inglés *Colony Forming Unit Granulocyte, Erytroid, Monocyte and Megakaryocyte cells*), la cual da origen a granulocitos, eritrocitos, monocitos y macrófagos; también las CFU's de colonias bi-potenciales como la unidad formadora de colonias de eritrocitos y megacariocitos y la CFU de granulocitos y macrófagos (CFU-eMK, del inglés *Colony Forming Unit Erytroid and Megakaroyocyte cells*, CFU-GM, del inglés *Colony Forming Unit Granulocyte and Macrophage cells*) y finalmente están las CFU uni-potentes las cuales están comprometidas a un solo linaje como lo es la BFU-de colonias eritroide (BFU-e, del inglés *Burst Forming Unit erytroid*) así como las CFU-G y CFU-M, de las cuales se derivan tanto granulocitos como monocitos respectivamente. Estas CFU's son las que dan origen a los precursores de las células maduras y es en estas etapas finales cuando los precursores así como las células maduras pueden ser identificados a simple vista al microscopio (Mayani 2007).

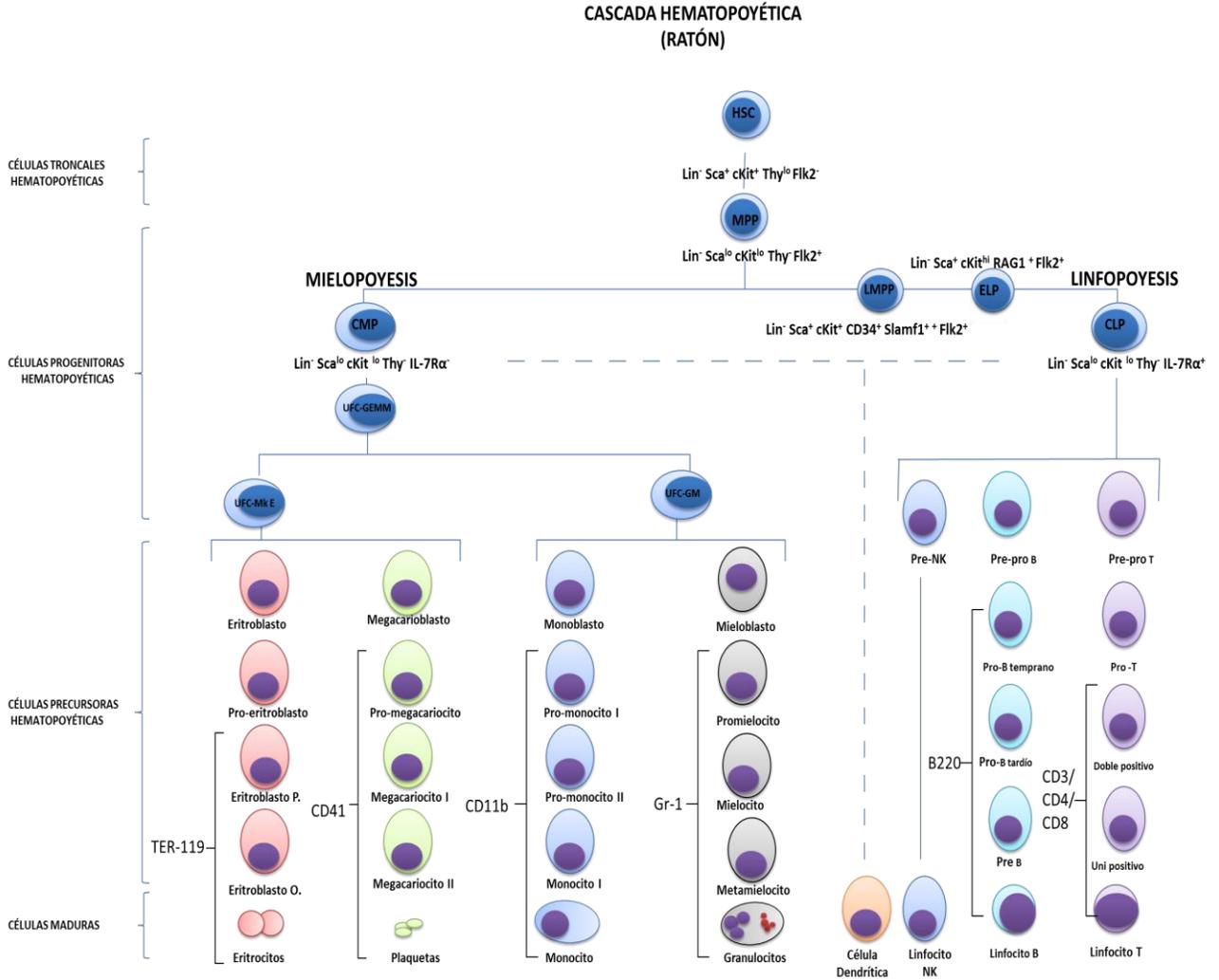


Figura 1.- Cascada hematopoyética, e Inmunofenotipo característico de las células troncales hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas y sus contrapartes maduras en ratón. LT-HSC, célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo; ST-HSC, célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo; MPP, progenitor multipotencial; LMPP, Progenitor multipotencial con predisposición linfoide; ELP, Progenitor linfoide temprano; CMP, progenitor mieloide común; CLP, progenitor linfoide común; UFC-GEMM (GEMM), unidad formadora de colonias granulocítica, eritroide, megariocítica y monocítica; UFC-MkE, unidad formadora de colonias megacariocito-eritroides; UFC-GM, unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago.

Las células troncales hematopoyéticas, ya sean las LT-HSC, o las ST-HSC, así como los MPP, los CLP o CMP, no pueden ser identificadas morfológicamente a simple vista, sin embargo, éstas pueden ser identificadas mediante antígenos específicos de cada población, lo cual es conocido como inmunofenotipo. Los cuales pueden ser evaluadas por microscopia de epifluorescencia o citometría de flujo (Tárnok, 2010). Existen inmunofenotipos específicos de estas células tanto para ratón como para humano (Bellantuono, 2004; Spangrude, 1988). Para las LT-HSC de ratón el inmunofenotipo más común es que no presenten antígenos específicos de algún linaje maduro, por lo tanto deben ser de linaje negativo (Lin^-), deben presentar una alta expresión de c-Kit ($c-kit^{alto}$), así como el antígeno de las células troncales (Sca^{alto}), una baja expresión del antígeno Thy 1.1 (Thy^{bajo}) y la ausencia del antígeno Flk2 ($Flk2^-$); quedando la nomenclatura final de $Lin^{negativo} Sca^{alto} c-Kit^{alto} Thy\ 1.1^{bajo} Flk2^-$ para estas células (Christensen, 2001; Spangrude 1988). Para la nomenclatura de las ST-HSC es característico encontrar una alta expresión del antígeno Flk2, el cual es muy útil para poder diferenciarlas de las LT-HSC; quedando la nomenclatura final de $Lin^{negativo} Sca^{alto} c-Kit^{alto} Thy\ 1.1^{bajo} Flk2^{alto}$ (Christensen, 2001; Morrison, 1997). Para la identificación de los progenitores multipotenciales (MPP) se ha detectado la ausencia del antígeno Thy 1.1 junto con la expresión de Flk2; quedando la nomenclatura de $Lin^{negativo} Sca-1^{bajo} cKit^{bajo} Thy\ 1.1^{negativo} Flk2^{alto}$. (Christensen, 2001; Morrison, 1994, 1997). Por otro lado, el uso de la expresión de la cadena alfa del receptor de la interleucina 7 (IL-7R α) es una herramienta útil para poder identificar y separar a los progenitores linfoides comunes de los progenitores mieloides con la identificación de los antígenos Sca-1 en baja proporción, así como el c-Kit y la ausencia de Thy 1.1 y la expresión del IL-7R α para los CLP; quedando la siguiente nomenclatura para esta población $Lin^{negativo} Sca-1^{alto/medio} cKit^{bajo/medio} Thy^- IL-7R\alpha^{alto}$ (Kikuchi 2005; Akashi, 2000). Es la ausencia del receptor de la IL-7 lo que caracteriza y ayuda a separar los CLP de los CMP quedando la nomenclatura final de $Lin^{negativo} Sca-1^{alto/medio} cKit^{bajo/medio} Thy^{negativo} IL-7R\alpha^{negativo}$ para los CMP (Akashi, 2000; Kondo, 1997) (Figura 1).

Para el monitoreo de las células troncales en humano y sus progenitores se ha identificado el antígeno CD34, el cual es expresado en cerca del 0.5-5% de las células de médula ósea. Este antígeno se ha observado sólo en las células troncales y progenitoras más no en las células maduras (Bellantuono, 2004; Civin, 1990) y este ha sido útil para poder separar las células troncales hematopoyéticas de los progenitores hematopoyéticos en conjunto con la asociación de otro antígeno denominado CD38 (Glimm, 2001; Bhatia 1997); quedando finalmente la nomenclatura para las LT-HSC de humanos el fenotipo CD34⁺CD38⁻ (Glimm, 2001; Bhatia 1997). Por otro lado para la población de los progenitores multipotenciales se observó la presencia en bajos niveles del CD38 quedando el inmunofenotipo de CD34⁺CD38^{bajo} para esta población, además al comparar la población CD34⁺CD38⁻ contra la población CD34⁺CD38^{bajo} se obtuvo que estas últimas perdían su capacidad de reconstitución a largo plazo por lo tanto determinaron que esta población correspondía a células MPP (Glimm, 2001; Bhatia 1997). La coexpresión de otros antígenos celulares tales como el CD10 o CD7 en las células CD34 positivas caracterizaba a los ELP (Hao, 2001; Ziegler 1999), y la baja expresión de IL-3R α lo, CD45RA⁻ en la población de células CD34⁺CD38⁺ se considera como la población de células progenitoras mieloides (Manz, 2002).

En cuanto a la identificación de las células precursoras y células maduras esta puede llevarse a cabo ya sea, mediante la observación morfológica de éstas en un microscopio de luz convencional, o bien mediante la identificación de antígenos específicos de linaje por medio de la citometría de flujo (Tárnok 2010). Los antígenos específicos de linaje pueden expresarse en diferentes niveles de la cascada de diferenciación; tal es el caso del antígeno Ly6-G (Gr-1) el cual puede ser identificado a partir de las células promielocíticas hasta los estadios más maduros de la serie granulocítica en médula ósea y su nivel de expresión está directamente correlacionado con el nivel de diferenciación de este linaje (Abbitt, 2009; Fleming, 1993). Para la identificación de la serie monocítica se utiliza el anticuerpo monoclonal CD11b/MAC-1 el cual es la cadena α_M de la integrina- β_2 ,

que es conocida como el receptor de complemento (CR3), el cual participa en la adhesión para C3bi e ICAM-1 (CD54) y puede ser expresada a partir del promielocito del linaje monocítico (Evans, 2009; Jacobsen 1994). Para el linaje megacariocítico se utiliza un anticuerpo específico que se une a la cadena α_{IIb} de la integrina CD41 la cual se expresa a partir de los megacariocitos y plaquetas, ésta puede unirse al fibrinógeno, vibronectina, fibronectina, al factor Von Willebrand y a la trombospodina, los cuales son factores fundamentales para la adhesión plaquetaria (Evans 2009; Matsumura-Takeda 2007). El linaje eritrocítico es identificado gracias al anticuerpo monoclonal TER-119, el cual reconoce una molécula asociada a la glicoforina A y es expresada a partir de la etapa de los eritroblastos ortocromáticos (Kina, 2000). Para el linaje linfoide se utiliza el anticuerpo B220, para poder identificar a los linfocitos B, este anticuerpo reacciona con un epítotope de dominio extracelular de la glicoproteína CD45 la cual es expresada a partir del estadio pro-B hasta las etapas más maduras del linfocito, así mismo también está presente en células B activadas y su expresión es menor en células plasmáticas y un subconjunto de células B de memoria (Hardy, 1991; Pelayo, 2005). Para el linaje de las células T, se utiliza un anticuerpo que identifica el receptor asociado al antígeno de superficie CD3, el cual es un conjunto de proteínas polipeptídicas unidas a la membrana denominado receptor de células T (TCR, del inglés *T cell receptor*). El cual es un antígeno expresado a partir de las células pro-T en timo (Deford-Watts, 2009) (Figura 1).

Linfopoyesis y mielopoyesis

Como ya mencionamos a partir de las células troncales hematopoyéticas se originan los progenitores multipotenciales que a su vez originaran a los CLP y los CMP (Laiosa 2006). Esta divergencia de linajes en la cascada hematopoyética está controlada por múltiples factores, ya sean extrínsecos o intrínsecos (Metcalf, 2008; Laiosa, 2006). Dentro de los factores extrínsecos más conocidos y mejor estudiados están las citocinas, las cuales se ha observado que mediante la unión a su ligando activan una cascada de señalización intracelular, la cual puede influir en la célula para que esta pueda dirigirse ya sea hacia el linaje mieloide o el linaje linfoide (Cochrane 2009; Laiosa, 2006). Por otro lado dentro de los factores intrínsecos están los activadores de genes denominados factores de transcripción, los cuales tienen como finalidad encender uno, o un conjunto de genes, que finalmente darán la orden específica a la célula para que ésta pueda diferenciarse hacia los diferentes linajes (Cochrane 2009; Metcalf, 2008; Laiosa, 2006).

Mielopoyesis

La mielopoyesis así como la linfopoyesis es un evento de suma importancia biológica ya que de este proceso se originan las células involucradas tanto en el transporte de oxígeno, la coagulación y la defensa innata del organismo, estos procesos son llevados a cabo por los eritrocitos, plaquetas y leucocitos (granulocitos, macrófagos y células dendríticas) respectivamente (Laiosa, 2006). Para que estas células puedan llevar a cabo estos procesos deben diferenciarse desde una HSC hasta una célula madura que lleve a cabo sus funciones de manera correcta. La mielopoyesis se lleva a cabo en la médula ósea (Rosmarin 2005; Mayani 2007) ya que es en este sitio donde las HSC dan origen a los MPP, los cuales como ya mencionamos tienen una alta capacidad proliferativa pero poca capacidad de auto-renovación, de estos MPP se van a derivar los CMP que darán origen a los diferentes linajes mieloides (granulocítico, monocítico, eritroide y megacariocíticos) (Mayani, 2007). La capacidad de diferenciación de los progenitores mieloides está regulada por los receptores de las citocinas y sus

ligandos los cuales activarán una cascada de señalización para activar los factores de transcripción específicos que influirán en la célula y dirigirla hacia algún linaje en específico (Ma. A. 2006). Dentro de la mielopoyesis existen genes característicos que están relacionados con cada uno de los diferentes linajes, dentro de estos genes clave podemos encontrar a PU.1, Hox, C/EBPa, C/EBPb y C/EPBe, SCL y RUNX1 (John, 2009; Rosenbauer, 2007; Lowry 2006; Laiosa, 2006; Cantor 2002; Back, 2005).

Linfopoyesis

Al igual que la mielopoyesis, la linfopoyesis es un proceso altamente regulado por factores intrínsecos y extrínsecos. Este evento es de suma importancia para el organismo ya que de él se derivan las células encargadas de la respuesta inmune de memoria como lo son los linfocitos B y T (Maeda 2007; Laiosa, 2006). La linfopoyesis en general se lleva a cabo en 2 órganos principalmente, en la médula ósea para la diferenciación de los linfocitos B y NK (Maeda, 2007) y otra parte en el timo para la diferenciación de los linfocitos T (Adolfsson, 2005; Mayani, 2007). En la médula ósea es a partir del Progenitor multipotencial predispuesto al linaje linfoide (LMPP, del inglés *lymphoid multipotent primed progenitor*) que se originan los ELP, estos progenitores darán a su vez a los CLP que finalmente darán origen a los linfocitos B y NK. Se cree que los ELP, son los candidatos más seguros para ser la población que migre de médula ósea hacia el timo para llevar a cabo la diferenciación de los linfocitos T (Welner, 2008). Para que se pueda llevar a cabo la diferenciación de los linfocitos debe existir la expresión de genes maestros para que la célula pueda diferenciarse hacia un linfocito B un T o un NK, dentro de éstos están el PU.1 e Ikaros los cuales son cruciales para pasar de células troncales a CLP (Maeda, 2007), y para la diferenciación linfoide B son cruciales el E2A, EBF y Pax 5. Por otro lado, son los factores de transcripción Id2 e Id3, los que juegan un papel fundamental para la diferenciación de los linfocitos NK (Mayani, 2007) y finalmente la presencia de NOTCH y sus ligandos así como el

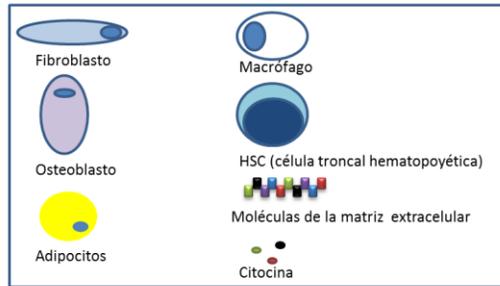
factor GATA 3 son cruciales para la diferenciación de la linfopoyesis de células T en el timo (Abe, 2010) (Figura 1).

Microambiente hematopoyético.

La hematopoyesis temprana se lleva a cabo en órganos hematopoyéticos específicos entre los cuales se encuentran el saco vitelino, bazo, hígado y la médula ósea (Yan 2011; Badillo, 2006). En la etapa adulta la diferenciación de las células troncales hacia las células sanguíneas maduras se lleva a cabo en la médula ósea (Lévesque, 2011; Coskun, 2010). La regulación de las células troncales hematopoyéticas es gobernada por dos entidades íntimamente relacionadas, uno son los factores intrínsecos y el otro es la composición de señales externas del microambiente de la médula ósea o factores extrínsecos. Y tanto los factores intrínsecos, como los factores de transcripción que regulan la expresión de genes así como las señales externas provenientes del microambiente de la médula ósea pueden ser mediadas, ya sea por interacciones célula- célula, matriz extracelular-célula o por factores solubles llamados factores de crecimiento o citocinas (Arai, 2009). Las diferentes interacciones junto a estos factores dan como resultado la promoción o inhibición de la proliferación, así como la diferenciación, migración, apoptosis e inclusive en el peor de los casos una transformación maligna. Este proceso se lleva a cabo en un microambiente específico denominado microambiente hematopoyético el cual es una estructura tridimensional que está compuesto de células del estroma las cuales generan productos que regulan al mismo microambiente, principalmente proteínas de la matriz extracelular, citocinas etc., (Mayani, 1992; Perkins, 1988). Las células del estroma (fibroblastos estromales, macrófagos, adipocitos, osteoblastos) confieren un soporte a las células hematopoyéticas, estas células pueden ser de origen mesenquimal o de origen hematopoyético tomando en consideración que los fibroblastos estromales, adipocitos y osteoblastos son de origen mesenquimal y los macrófagos de origen hematopoyético (Mayani, 1992). Estas células en su conjunto proveen citocinas para el desarrollo de las células hematopoyéticas, tal

es el caso del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés), el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), así como las interleucinas (IL, del inglés *interleukin*) IL-1, IL-3, IL-6 e IL-8 así como el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumoral necrosis factor*) (Flores, 2006). En el microambiente hematopoyético se encuentran también moléculas de la matriz extracelular generadas por los fibroblastos estromales tales como heparan sulfato, ácido hialurónico, fibronectina y colágena ya sea del tipo I, II y III, las cuales interactúan con las células hematopoyéticas así como también con las citocinas confiriéndoles así estabilidad, localización y aumento en su tiempo de vida (Arai, 2009) (Figura 2).

MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO



1.- Producción de citocinas mediada por células del microambiente hematopoyético.

2.- Interacción de moléculas de la matriz extracelular con las células hematopoyéticas y las citocinas.

3.- Interacción de las células hematopoyéticas con las células del estroma celular (nicho hematopoyético).

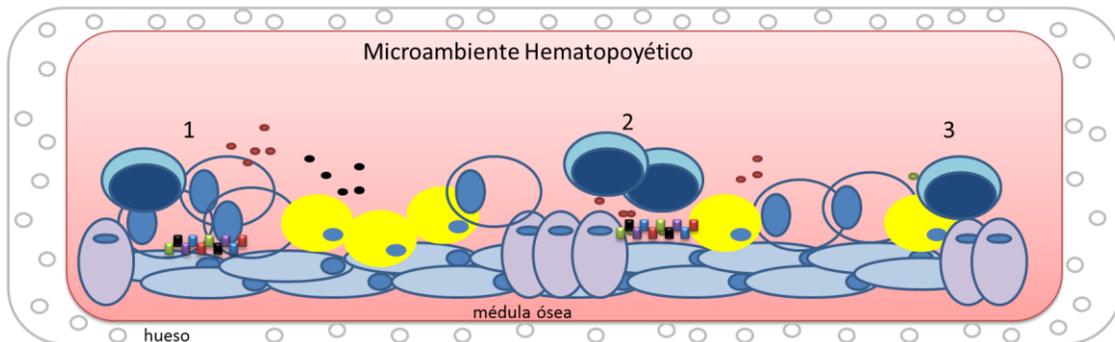


Figura 2.- El Microambiente hematopoyético esta compuesto por diferentes tipos celulares como lo son; osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos y macrófagos, en conjunto estas células inducen una producción de citocinas hematopoyéticas que regulan diversas funciones en la célula (proliferación, diferenciación, maduración etc.), (1) dentro de este microambiente existe una interacción entre las moléculas de la matriz extracelular con las diferentes células y las citocinas para que éstas puedan regular diferentes funciones en la célula como la migración, proliferación, activación etc. (2), las células hematopoyéticas interactúan con las células del estroma celular dando así origen al nicho hematopoyético (3).

Hematopoyesis esplénica

Durante la etapa fetal la mayoría de los procesos hematopoyéticos ocurren dentro del hígado, el cual es colonizado a partir del día 10 y el día 11.5 por células hematopoyéticas provenientes de la zona aorta-gónada-mesonefros (AGM). Se sabe que el bazo fetal no produce en si células troncales hematopoyéticas sino que es colonizado por éstas y esta colonización toma lugar aproximadamente entre el día 12.5 y 13 y se presume que estas células son provenientes del hígado fetal (Bertrand, 2005). Éste permanece como órgano hematopoyético hasta las dos primeras semanas después del nacimiento. En la etapa embrionaria el bazo se forma a partir de día 11.5 por una condensación de células del mesénquima mesodermal del lado mesogastrio dorsal del estómago. El bazo está organizado por una pulpa roja en la que se encuentran primordialmente eritrocitos y monocitos, la cual está separada por una zona marginal de la pulpa blanca que es donde se encuentran principalmente macrófagos y linfocitos B. Se ha observado que el bazo fetal no es capaz de poder sostener la hematopoyesis de HSC debido a la ausencia de señales necesarias para dicho evento (Bertrand, 2006), sin embargo, se ha observado que el bazo fetal se pueden detectar precursores de células B y evidencia experimental soporta la idea de que en microambiente del bazo es capaz de poder sostener la proliferación de células B (Von Freeden-Jeffry, 1995). Por otra parte existen experimentos que dicen lo contrario y sostienen que este evento es originado por progenitores de células B provenientes de hígado fetal y sólo llegan a bazo a diferenciarse. En cuanto a las células mieloides existe evidencia *in vitro* que el microambiente del bazo es capaz de proveer factores necesarios para que se desarrolle la diferenciación de macrófagos, tal es el caso del M-CSF y de al menos un factor de transcripción que promueven este linaje (tal es el caso de PU.1). Durante el desarrollo del bazo fetal se sabe que es colonizado por macrófagos que son provenientes del saco vitelino a partir del día 12. Ya en etapa adulta los macrófagos se encuentran en la pulpa roja y éstos son considerados parte fundamental de la organogénesis y pueden contribuir a la eritropoyesis (Sadahira 2000). También se ha reportado que células del estroma

de bazo fetal y neonatal son capaces de secretar TGF- β e IL10 dándonos una idea de que el estroma esplénico crea un ambiente poco favorable para el desarrollo de las células T, ya que dichas citocinas regulan la proliferación de linfocitos T (Coombes 2005). Esto hace pensar que los macrófagos y el microambiente creado por las células del estroma del bazo pudiesen controlar la linfopoyesis T en etapas embrionarias y aun en los recién nacidos (Coombes 2005).

Citocinas y receptores de citocinas

El control de la hematopoyesis como ya lo hemos mencionado es regulado por una serie de glicoproteínas de bajo peso molecular (menos de 32kDa), llamadas citocinas las cuales se encuentran en el microambiente hematopoyético (Metcalf, 2008). Cultivos *in vitro* del tejido hematopoyético a largo plazo han permitido establecer que la hematopoyesis se sostiene debido a que las células del estroma secretan diversas citocinas tales el caso de las interleucinas IL 1a, IL1b, IL-2, IL-7, IL-10, IL13, entre otras; así mismo también secretan los diferentes factores estimuladores de colonias, los cuales han sido estudiados durante los últimos 30 años y contribuyen esencialmente al desarrollo de los 8 linajes celulares hematopoyéticos (Metcalf, 2008; Laoisa, 2006). Estos factores estimuladores incluyen al factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, del inglés *macrophage colony stimulator factor*), el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF, del inglés *granulocyte colony stimulator factor*), el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF, del inglés *granulocyte and macrophage colony stimulator factor*), el factor estimulador de células tallo (SCF, del inglés *stem cell factor*), factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumoral necrosis factor*), el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β , del inglés *tumoral growth factor beta*) y el factor estimulador de colonias múltiples mejor conocido como Interleucina 3 (IL-3) (Baker 2007, Robb 2007). Estos factores tienen un amplio efecto en la función biológica de varios tejidos y células entre los efectos más importantes de estos estimuladores celulares son que, intervienen en la supervivencia, proliferación, diferenciación de las células así mismo modulan

también funciones celulares como son la quimiotaxis, degranulación, activación, adhesión, citotoxicidad, cambios fenotípicos y la expresión de mRNA de estas poblaciones celulares (Metcalf, 2008). Aunque existen muchos tipos de células productoras de citocinas, dentro del microambiente hematopoyético son las células del estroma las que proporcionan una gran variedad de citocinas como lo son G-CSF, M-CSF, IL1, IL-3, IL6, IL-8, TNF α (Ramakrishnan, 2010), dentro del sistema inmune innato los macrófagos son las células más comprometidas en la síntesis de citocinas, mientras que en el sistema inmune específico las células T colaboradoras son las que se encargan de la producción de citocinas (Diaconu 2010). Dentro de las características específicas de las citocinas destacan dos principales, una es que, éstas pueden presentar funciones pleiotrópicas, lo que significa que una citocina puede tener efecto en diferentes células y por el otro lado es que pueden ser redundantes, esto es que varias citocinas puede llevar a cabo el mismo efecto en una misma célula (Xiao, 2007, Baksheev, 2007). Así mismo las citocinas pueden llevar a cabo sus efectos de manera local o sistémica, el efecto local se realiza cerca de donde la citocina fue producida y el efecto sistémico es cuando una citocina actúa lejos del lugar donde fue producida como es el caso de la eritropoyetina, la cual es producida en los riñones y su efecto se observa en la médula ósea (Arcasoy, 2008; Baksheev, 2007).

Las citocinas se unen a su receptor para mediar una señal intracelular que tiene como resultado final la expresión de un gen (Metcalf, 2007). A nivel estructural básico la mayoría de los receptores de las citocinas consisten en un complejo de subunidades las cuales están compuestas principalmente por una subunidad de unión a su ligando (citocina), una fracción transmembranal y una subunidad intracelular que se encargara de transmitir la señal de transducción al interior de la célula (Baker, 2007; Taniguchi 2005). La subunidad encargada de transmitir la señal intracelular puede ser compartida por diferentes receptores creando así una familia de receptores en la cual la misma subunidad es la que transmite la cascada de señalización intracelular (Baker, 2007; Taniguchi 2005). La mayoría de los subtipos de receptores de las citocinas están agrupados en diferentes subfamilias

dependiendo de la estructura del receptor (Metcalf, 2007; Barry, 1997; Miyajima, 1992). Existen 5 familias de receptores de citocinas donde los receptores de la familia uno engloba a la mayoría de los receptores de las citocinas hematopoyéticas tal es el caso del GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, HGF y prolactina, esta familia se caracteriza por que su dominio extracelular no va más allá de 210 amino ácidos (a.a) y este sitio puede contener uno o más residuos conservados de cisteína (C). También presentan una segunda secuencia conservada de residuos del tipo triptófano-serina-X-triptófano-serina (W-S-X-W-S), donde X, se refiere a un residuo no conservado de algún aminoácido, la región extracelular también cuenta con dos dominios de fibronectina considerados como módulos de fibronectina III, una región de bisagra que conecta estos dos módulos la cual está compuesta de aproximadamente 100 a.a. Esta región que también guarda al motivo W-S-X-W-S está destinada para ser el dominio de interacción con el ligando (Barry, 1997). Por otra parte el dominio citoplasmático del receptor de la citocina está compuesto por una región proximal a la membrana la cual recibe el nombre de Box 1 el cual es un motivo rico en prolina, así mismo también cuenta con otra fracción cerca a Box1 denominada Box 2 (Ihle, 1995). La región Box 1 es fundamental para las señales de diferenciación, ya que esta región es la que se encarga de mediar las señales mitogénicas en la célula (Ihle, 1995). Ciertas regiones citoplasmáticas del receptor que no contienen ni Box 1 ni Box 2 y pueden variar de receptor a receptor. La segunda familia es la de los receptores tipo 2, la cual se caracteriza por tener un dominio conservado de cisteína, en esta familia encontramos al receptor del interferón α , β y γ , así como la IL-10. La tercer familia esta compuesta por aquellos receptores con dominios extramembranales tipo inmunoglobulina y está compuesta principalmente por el receptor de G-CSF. La cuarta familia es la del receptor del factor de necrosis tumoral, está compuesta por el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nervious growth factor*), CD40 y el TNF (Baker, 2007). La quinta familia que corresponde a los receptores acoplados a proteínas G, la cual se caracteriza por tener 7 dominios transmembranales y está compuesta básicamente por las quimiocinas (Steevels, 2011; Baker, 2007). Por otro lado están los receptores tipo

tirosina cinasa los cuales se caracterizan por tener 5 dominios tipo inmunoglobulina en la región extracelular, seguido de un dominio intracelular de 70-10 a.a aproximadamente (Prieto-Echagüe 2011). En esta familia podemos agrupar al receptor C-kit, al factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), al factor de crecimiento derivado de plaquetas principalmente (PDGF, del inglés *platelet derived growth factor*) (Baker, 2007) (Figura 3).

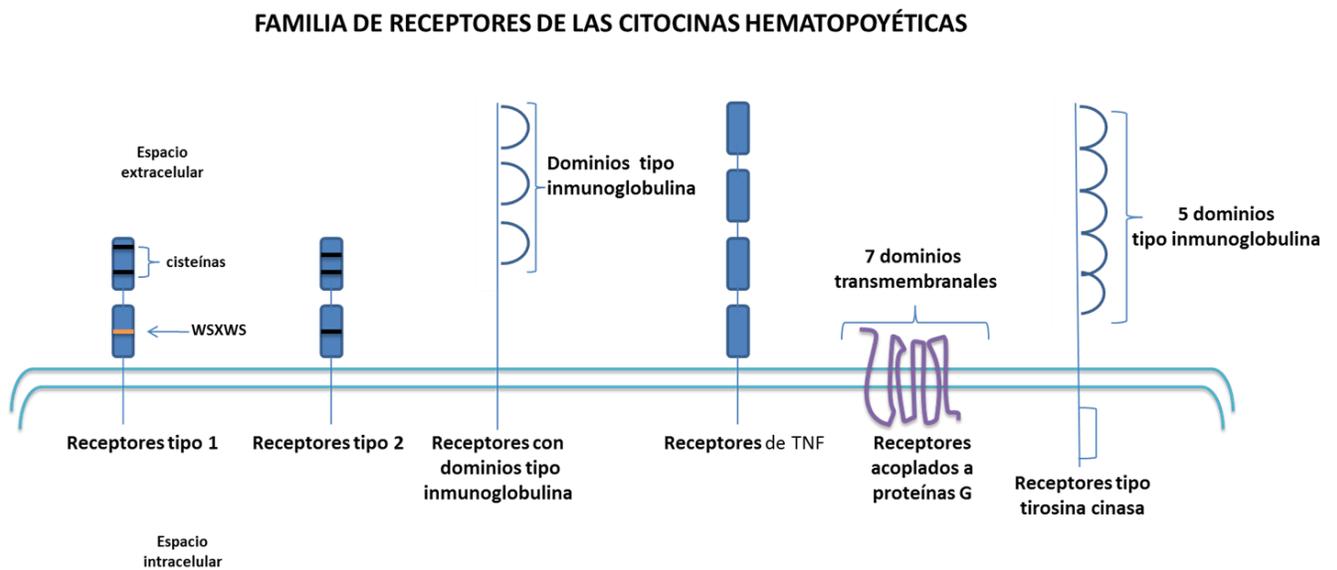


Figura 3.- Características estructurales de las diferentes familias de los receptores de la citocinas hematopoyéticas. Las familias de los receptores esta compuesta principalmente por la familia de los receptores tipo 1 (GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-13, IL-15, HGF y prolactina, principalmente), la familia de los receptores tipo 2 (INF α , β , y así como la IL-10) ; familia de receptores con dominio tipo inmunoglobulina (G-CSF, principalmente); La cuarta familia es la del receptor del factor de necrosis tumoral (NGF, CD40 y el TNF principalmente); la quinta familia correspondiente a la de los receptores con 7 dominios transmembranales (quimiocinas); La familia de receptores tipo tirosina cinasa (M-CSF, SCF e IL-1).

Una segunda manera de poder dividir los receptores de las citocinas hematopoyéticas es mediante su sub-unidad funcional intracelular (Baker, 2007). La familia de los receptores que comparten la subunidad intracelular de la cadena β , gp-130, donde en esta familia encontramos a los receptores de las interleucinas (IL) 6, IL-11, IL-12, la cardiotropina 1, el factor neurotrófico ciliar, la oncostatina M el factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés *leukemia inhibitor factor*) (Baker, 2007). También está la familia del receptor de la IL-2, estos receptores tienen la característica de tener tres subunidades, la cadena α , la cadena β y la cadena γ , y las citocinas que componen esta subfamilia son, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, en estas citocinas la cadena alfa sirve como la subunidad de ligando mientras que la cadena beta y la cadena gama son las encargadas de transmitir la señal de transducción (Russell, 1994, 1995). La tercer familia, es la de los receptores de las hormonas de crecimiento la cual se caracteriza por transmitir su señal a través de una sola cadena, estos receptores consisten en una sola subunidad y pueden formar homodímeros, los cuales sirven como sitios de unión al ligando (Baker, 2007), dentro de esta familia se incluye a los receptores de hormonas de crecimiento como la prolactina, la eritropoyetina (EPO), el G-CSF y la trombopoyetina (TPO). La cuarta familia, es la del receptor del interferón (INF), donde la señal se da a través de dos o más sub unidades, esta familia está compuesta por el receptor de interferón α (INF α) y la IL-10. Finalmente la familia de la subunidad gp140, la cual es una serie de receptores donde la señal se lleva a cabo a través de la sub unidad gp140 y una sub-unidad de unión al ligando denominada subunidad α . Esta familia incluye receptores para las citocinas tales como el IL-3, IL-5, y el GM-CSF (Blalock, 1999; Murata, 1992). (Figura 4)

Transducción de señales de las citocinas

La finalidad de una citocina al unirse con su receptor es la de encender un gen para poder inducir una respuesta biológica. Este evento se lleva a cabo mediante una señal de transducción la cual se desencadena cuando el receptor se une a su ligando y es dependiendo del tipo de receptor y del ligando la cascada de señalización que se activa (Baker, 2007). Los receptores de citocinas hematopoyéticas a excepción de los receptores tirosina cinasa, están involucrados con una cascada de señalización conocida como la vía de una familia de tirosinas cinasas llamadas Janus cinasas o JAK's. La familia de JAK está compuesta por 4 miembros JAK1, JAK 2, JAK 3 y TYK2 (Ilhe, 1997; Darnell, 1994). Aunque el preciso mecanismo por el cual el ligando una vez unido a su receptor es capaz de encender a JAK no es del todo conocido, diferentes estudios han llevado a la suposición de diferentes modelos para la explicación de la activación de JAK. Dentro de estos modelos propuestos el más aceptado es el que mediante la unión del receptor con su ligando se lleva a cabo una dimerización/oligomerización de lo cual resulta una yuxtaposición de JAK, una vez que se da este evento, la activación de JAK parece ser resultado de su fosforilación, ya sea porque ésta se autofosforila o la fosforilación es a través de otras JAK's o de otra familia de tirosina cinasas (Ilhe, 1997; Darnell, 1994). El blanco de las JAK's es activar a un grupo de señales transductoras activadoras de la transcripción (STAT's, del inglés *signal transducer activator transcription*), por lo tanto se ha establecido que el sustrato de JAK es STAT. Las STAT's juegan un papel fundamental y crítico en la activación de las señales de transcripción de las citocinas y las neuroquinas (O'Shea, 2002; Darnell, 1994, 1997). La familia de las STAT's, está compuesta por 6 diferentes isoformas (STAT 1- STAT 6) y la activación de cada una de éstas depende de las diferentes sub-unidades de los diferentes receptores de las citocinas. La finalidad de STAT es la de translocarse al núcleo de la célula para encender genes promotores los cuales desempeñaran una función específica (O'Shea, 2002; Darnell, 1994). En la activación de la vía JAK-STAT pueden participar otra serie de cinasas como lo es la cinasa Src, la cual ayuda a la

fosforilación de STAT's (Reddy, 2000), y es también característico de esta vía que se pueda encender cascadas de señalización alternas como lo es la vía PI3K-AKT y la vía RAF-ERK, así como la vía RAS-MAPK (Gartsbein, 2006; Reddy, 2000) (Figura 4)

Por otra parte la cascada de señalización de los receptores tipo tirosina cinasa tienen la particularidad de activar la cascada de señalización que involucra segundos mensajeros como lo es el adenosina monofosfato cíclico (AMPc, del inglés *adenosin monophosphat cíclic*), así como la cascada de señalización que involucra al PI3K-AKT, la vía RAS-MAPK, la vía p85-AKT, así como también la vía alternativa de JAK-STAT (Vanhaesebroeck, 2010; Baker, 2007).

El objetivo final de ambas vías es la de activar factores de transcripción que encenderán genes específicos los cuales influirán sobre el linaje mieloide o linfoide. Tal es el caso para el linaje mieloide: PU.1 (influye sobre las células granulocito-macrófago, megacariocito-eritroide y células dendríticas), C/EBPa (influye sobre células troncales hematopoyéticas y las granulocito-macrófago), C/EBPb (influye sobre células granulocito-macrófago), GATA1 (influye en las células megacariocito-Eritroide), FOG (influye en células megacariocito eritroide), Id2 (tiene influencia principalmente sobre células dendríticas), RelB (influye en las células dendríticas) por mencionar algunos. Para el linaje linfoide: RelB (influye sobre células B), C/EBPb (sobre células B), EBF (influye sobre células B), Pax 5: (influye sobre células B), Ikaros, (influye sobre células B, T, NK), PU.1: (influye sobre células B, T, NK), E2A: (influye sobre células B, T) Id3: (influye sobre células B, T), NOTCH 1 : (influye sobre células T), GATA 3: (influye sobre células T), HEB (influye sobre células T), por mencionar algunos (Baker, 2007; liaosa, 2006) (Figura 4).

SUBUNIDADES FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES DE LAS CITOCINAS HEMATOPOYÉTICAS

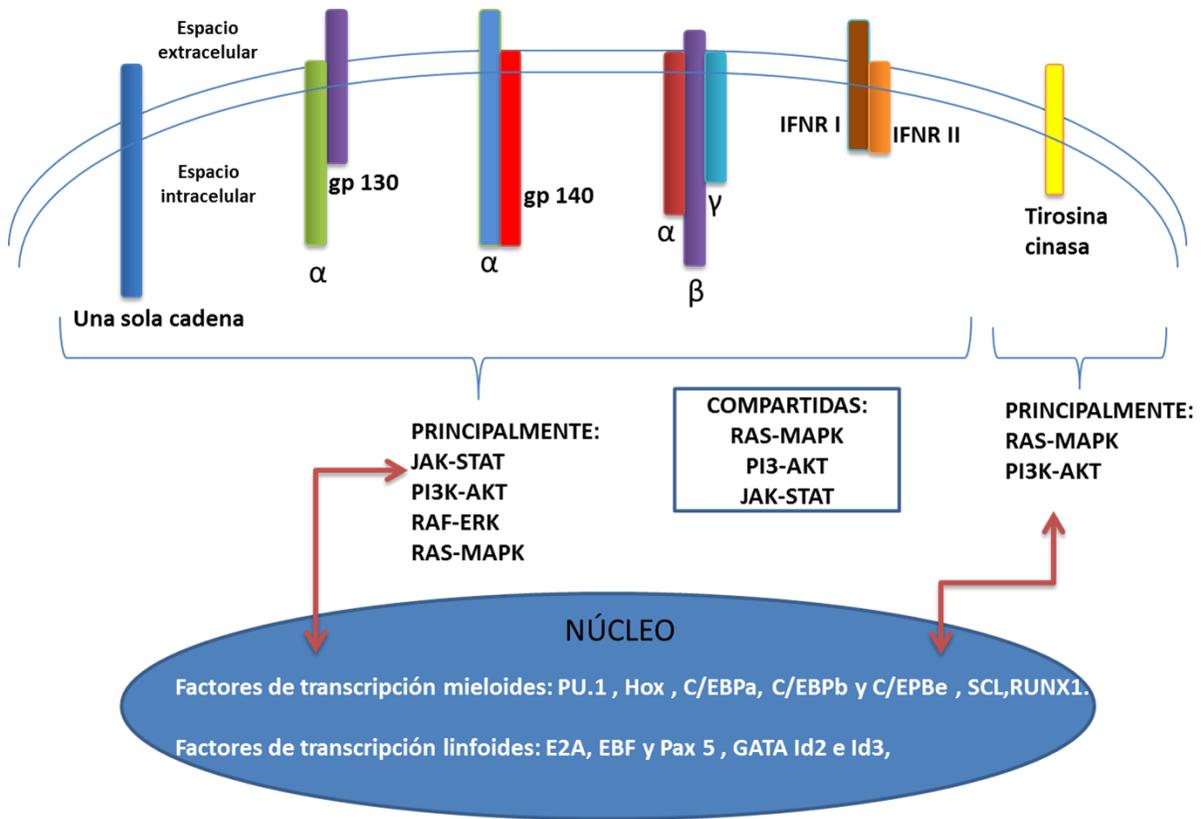


Figura 4.- Clasificación de los receptores de las citocinas hematopoyéticas mediante sus diferentes sub unidades funcionales y las diferentes vías de señalización que encienden. Diferentes vías de transducción relacionas por estas subunidades así como la convergencia que puede existir entre ellas para la activación de diferentes factores de transcripción importantes implicados en la hematopoyesis.

Biomoléculas activadoras de hematopoyesis

Como ya hemos mencionado, los factores de crecimiento hematopoyético regulan la hematopoyesis controlando la proliferación, diferenciación, migración e inclusive la muerte de las células hematopoyéticas, sin embargo, hay evidencia de que estas glicoproteínas no son las únicas que pueden influir en la hematopoyesis, ya que existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta a las citocinas que pueden tener efectos similares sobre las células del sistema hematopoyético, dentro de las que se encuentran la vitamina E, la cual incrementa en ratones irradiados el número de linfocitos y granulocitos en sangre periférica, tras su administración vía intraperitoneal a los 20 días post-radiación (Cherdyntseva, 2005), o el caso de la vitamina A la cual induce un aumento de la eritropoyesis vía inducción de TPO (Chen, 2009; Zimmermann, 2006), también el ácido retinoico (ATRA, del inglés All-trans retinoic acid) el cual tiene efectos sobre la linfopoyesis B y que regula de manera negativa la eritropoyesis y megacariopoyesis (Chen, 2009; Yousefi, 2009), así como la principal proteína de la leche, la caseína y su sal el caseinato de sodio (CasNa) los cuales inducen un incremento en la concentración de citocinas que influyen en la mielopoyesis, en suero y en exudado de la cavidad peritoneal (Metcalf, 1996; Lotem and Sachs, 1983, 1985).

Tanto la leche como los productos lácteos son la base de la dieta humana. La leche bovina representa una de las fuentes de alimento con más alto consumo a nivel mundial (Walstra, 1984), está constituida por 3.6 % de proteínas, 4.1% de grasas, 5.0% de carbohidratos, menos del 1% de vitaminas y minerales y un 86% de agua. La fracción proteica está compuesta por alfa-lactalbúmina, beta-lactalbúmina y caseína, de las cuales esta última es el principal componente con un 80%. La caseína se encuentra en forma de micelas, conformada por cuatro cadenas polipeptídicas designadas como alfa-s1 caseína, alfa-s2 caseína, beta-caseína y k-caseína. La caseína cuando es diluida en un álcali produce sales, uno de ellos es el caseinato de sodio (CasNa).

Algunos antecedentes sustentan que la eliminación de caseína en la dieta de ratas y ratones provoca mielosupresión (Stanović, 1996) y una producción deficiente de eritrocitos a consecuencia de la reducción en la producción de eritropoyetina (Okano, 1992), por otro lado se ha reportado que la inyección de caseinato de sodio en la cavidad peritoneal de ratón, además de movilizar granulocitos, macrófagos y linfocitos también induce aumento en la concentración de factores estimuladores de colonias tanto en suero como en el exudado de la cavidad peritoneal (Metcalf, 1996; Lotem and Sachs, 1983). En otra investigación se observó que la inyección subcutánea de caseína permite la sobrevivencia de ratones inyectados con dosis letales de bacterias, actividad que se debe a la elevación de los niveles del G-CSF el cual activa a los granulocito-neutrófilos para eliminar a las bacterias (Noursadeghi, 2002). En otro estudio se observa como el CasNa es capaz de aumentar el número de CMN y precursores mieloides en médula ósea *in vivo*, un evento considerado como activación de hematopoyesis (Donahue, 1986; Liebermann, 1989). En cuanto al efecto del CasNa sobre el linaje linfoide los antecedentes son escasos sin embargo se ha reportado que la β -caseína induce un incremento de linfocitos T y B *in vitro* (Wong, 1996). Y en otro estudio se reporta lo contrario en cuanto a los linfocitos T, ya que el grupo de Pessi, reporta que la caseína inhibe la proliferación de linfocitos T *in vitro* (Pessi, 2001)

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el CasNa *in vitro* reduce la proliferación e induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de las células 32D (una línea hematopoyética multipotencial dependiente de interleucina-3 y ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis) (Ramos, 2004), posteriormente publicamos que la diferenciación morfológica se acompaña de la inducción a la expresión del gen del M-CSF y su receptor M-CSFR (Ramos, 2004), además hemos mostrado que la adición de CasNa al cultivo de la línea leucémica mielomonocítica WEHI-3 de ratón, bloquea su proliferación celular (Ramos-Mandujano, 2008). Por otro lado también hemos reportado que la adición de CasNa al cultivo de células mononucleadas normales de médula ósea de ratón,

en presencia de IL-3, se observa un incremento en el número de estas células (Martínez, 2006), en un estudio adicional reportamos que el CasNa es capaz de incrementar el índice esplénico en ratones tratados intraperitonealmente con la proteína, aumentando adicionalmente el tamaño de los centros germinales (Lagunez, 2004). Finalmente en otro estudio demostramos que el CasNa acelera la diferenciación de neutrófilos en banda hacia polimorfonucleares e incrementan la producción de M-CSF *in vitro*, indicando que estas células no pierden su funcionalidad (Santiago-Osorio, 2010).

Ante este panorama, la evidencia del efecto del CasNa tanto *in vitro* como *in vivo* sobre células hematopoyéticas al parecer aún no es muy clara y contundente por lo que surge la necesidad de aclarar el papel del CasNa sobre células hematopoyéticas en un modelo *in vivo*, así mismo observar si este efecto se lleva de igual manera tanto en el linaje linfoide como en el linaje mieloide, para quizás en un futuro en base a estas observaciones el CasNa pudiese tener una aplicación clínica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad un problema existente dentro de los padecimientos oncológicos es que, entre el lapso de tiempo donde el paciente recibe el tratamiento de quimio o radioterapia antes del trasplante de médula ósea y durante el periodo de recuperación del sistema hematopoyético posterior al trasplante, el paciente está expuesto a contraer infecciones nosocomiales, esto debido a que el sistema inmune es ineficiente o esta en recuperación (Zaph, 2010; Popa, 2005; Millon, 1994). Por lo tanto surge la necesidad de encontrar nuevos agentes o moléculas que ayuden a las células hematopoyéticas a proliferar de una manera más rápida, así como la de poder activar o potencializar la respuesta de las células del sistema inmune para combatir agentes patógenos que ponen en riesgo la vida del paciente.

Por otro lado, se ha observado que el CasNa *in vitro* es capaz de aumentar el número de células mononucleadas (Martínez, 2006), así como también inducir la proliferación de linfocitos T y B (Wong, 1996) y acelerar la diferenciación del linaje granulocítico (Santiago, 2010), otros experimentos demuestran que tras la inyección de CasNa en cavidad peritoneal aumenta el número de precursores mieloides en médula ósea (Lieberman 1989; Lord, 1993), además de incrementar la concentración de los niveles de factores estimuladores de colonias mieloides, como el G-CSF, M-CSF y GM-CSF (Metcalf, 1996; Lotem and Sachs, 1983, 1985). Ante este panorama observamos que el CasNa influye sobre células tanto mieloides y linfoides *in vitro* principalmente, sin embargo, es necesario estudiar sus efectos *in vivo* para aclarar el papel del CasNa sobre la linfopoyesis y mielopoyesis y ver si estos pudiesen tener una aplicación clínica a futuro.

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados previamente, el CasNa es capaz de inducir proliferación de células de linaje mieloide y linfoide, así como el aumento en la concentración de citocinas involucradas en la mielopoyesis y linfopoyesis bajo nuestro modelo de tratamiento *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vivo* el efecto del CasNa en la proliferación de células de linaje mieloide y linfoide así como la producción de citocinas involucradas en su generación.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar si el CasNa es capaz de:

- 1.- Inducir la proliferación de granulocitos, macrófagos, megacariocitos, eritrocitos, linfocitos T y B.
- 2.- Incrementar la producción de citocinas involucradas en el linaje mieloide (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, EPO y TPO) y linfoide (IL-2, IL-7 e IL-15).
- 3.- Activar granulocitos, macrófagos, linfocitos B y T.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Ratones BALB/c de 8 a 12 semanas de edad fueron mantenidos y alimentados *ad libitum*, bajo condiciones estériles y libres de patógenos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Todos los experimentos fueron realizados bajo las leyes y normas mexicanas para el trato y protección de animales.

Tratamiento de ratones con CasNa

Los ratones fueron divididos en 3 grupos y cada grupo estuvo conformado por 5 ratones: el grupo control que no recibió tratamiento alguno, el grupo vehículo que solo recibió 1 ml de PBS, y el grupo de tratamiento con CasNa que recibió 1 ml de PBS al 10% de CasNa (0.1g CasNa/1ml PBS). Los ratones del grupo vehículo y CasNa se inyectaron vía intraperitoneal (IP) cada 48h por 7 días.

Obtención de células mononucleadas

Después del tratamiento, los tres grupos de ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se obtuvieron tanto los fémures, bazos y timos. Esto se realizó en campana de cultivo, previamente desinfectada con alcohol al 70% y esterilizada por 20 minutos con luz ultravioleta (UV): los fémures se colocaron en cajas petri con medio Iscove's. Posteriormente se cortaron las epífisis de cada fémur de cada grupo, evitando que se astillaran y con una jeringa de insulina de 1 ml con medio de Iscove's suplementado con SFB al 10% se extrajeron las células totales de médula ósea mediante arrastre celular. La suspensión celular fue centrifugada para obtener el botón celular de cada grupo, posteriormente se colocaron cuidadosamente en gradiente de densidad con Ficoll en tubos cónicos y se centrifugaron por 20 minutos a 500g para obtener las células mononucleadas finalmente, fueron lavadas 3 veces con medio Iscove's con 10% de SFB para su posterior análisis.

Obtención de células de Bazo

Los bazos se envolvieron en un filtro y se depositaron en cajas Petri con 4 ml de medio Iscove's, se prensaron con un émbolo de jeringa hasta liberar las células sanguíneas. La suspensión celular se centrifugó para obtener el botón celular de cada grupo, la cual se colocó en tubos con 4 ml de medio Iscove's y SFB al 10%. Posteriormente las células totales obtenidas fueron depositadas en tubos cónicos con 2ml de medio Iscove's y 10% de SFB, posteriormente se colocaron cuidadosamente en gradiente de densidad con Ficoll en tubos cónicos y se centrifugaron por 20 minutos a 500g para obtener las células mononucleadas, éstas fueron lavadas dos veces con medio Iscove's y SFB al 10%, y finalmente se realizó el conteo directo de células mononucleadas.

Obtención de células de Timo.

Los timos obtenidos se envolvieron en un filtro y se depositaron en cajas Petri con 4 ml de medio Iscoves, se prensaron con un émbolo de jeringa hasta liberar las células sanguíneas. La suspensión celular se centrifugó para obtener el botón celular de cada grupo, la cual se colocó en tubos con 4 ml de medio Iscove's, SFB al 10 posteriormente se colocaron cuidadosamente en gradiente de densidad con Ficoll en tubos cónicos y se centrifugaron por 20 minutos a 500g para obtener las células mononucleadas, éstas fueron lavadas dos veces con medio Iscove's y SFB al 10%, y finalmente se realizó el conteo directo de células mononucleadas.

Viabilidad y número celular

Se evaluó en un hemocitómetro por medio de la incorporación de azul tripano (Sigma USA), con una dilución 1:1 con colorante azul tripano.

Morfología celular

Para el análisis de la morfología de las células mononucleadas obtenidas de médula ósea, fueron teñidas con el colorante Wright para hacer un conteo diferencial de la morfología observada bajo el microscopio (BH-2, Olympus, Japan). (Biermann, 1999):

Mieloblastos: células entre 15 y 20 μm de diámetro con núcleo redondo y cromatina laxa con uno o más nucléolos con alta relación núcleo citoplasma sin gránulos en el citoplasma. Los promielocitos difieren de los mieloblastos por la aparición de gránulos azurófilos en el citoplasma.

Mielocitos: difieren de los promielocitos por la aparición de gránulos neutrofílicos. Con núcleo redondo y la cromatina condensada sin nucléolos presentes en el núcleo. Con un citoplasma ovalado y el núcleo levemente indentado.

Metamielocitos: difieren de los mielocitos por la aparición de núcleo indentado.

Neutrófilos en banda: éstos difieren de los metamielocitos por la presencia del núcleo en forma de dona.

Neutrófilos maduros: éstos difieren de los neutrófilos en banda por la aparición de núcleo dividido en lóbulos.

Ensayos de proliferación por citometría de flujo

Una vez realizado el tratamiento con solo vehículo o CasNa los ratones fueron inyectados i.p con bromodeoxiuridina (BrdU; 2 mg of BrdU/animal; BD Biosciences) 24 h antes de su sacrificio y después de la última dosis. Las células mononucleadas fueron obtenidas de médula ósea, bazo, timo y cavidad peritoneal mediante gradiente de densidad con Ficoll (1.077 g/L, Sigma, México) posteriormente la densidad fue ajustada a 2×10^6 en 1ml de PBS, y las células fueron teñidas con anticuerpos de superficie para el linaje granulocítico con anti-Ly-6G (Gr-1) marcado con ficoeritrina (PE), con anti-CD11b/MAC-1 (MAC-1)

marcado con Cy5 para el linaje monocito-macrófago, anti-TER-119 marcado con PerCP Cy5 para el linaje eritroide, anti-CD41 marcado con PE para el linaje megacariocítico, anti-B220 marcado con Cy5 para el linaje linfoide B, anti-CD4 marcado con Cy5 PE, anti-CD8 marcado con PE para el linaje linfoide T. Para detectar la proliferación de los diferentes linajes las células, fueron fijadas para posteriormente ser permeabilizadas y teñidas con anti- BrdU marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de acuerdo con el protocolo del manual de procedimiento del Kit de BrdU para citometría de flujo. Al finalizar el procedimiento de tinción, las células fueron resuspendidas en 0.3 ml de paraformaldehído al 1% en PBS. Los análisis de los fenotipos celulares y la incorporación de BrdU se realizaron en un citometro FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA) con el software Pro v.5.1.1 BD (Becton Dickinson) de acuerdo a los manuales de procedimiento. Se adquirieron 50,000 células por muestra para cada análisis.

Índice fagocítico

Para el ensayo del índice fagocítico (IF), se utilizaron levaduras *C. albicans* que fueron mantenidas en medio Sabouraud subcultivadas en medio agar 72 h antes de utilizarlas. Las levaduras fueron lavadas 3 veces en PBS y ajustadas a una densidad óptica de 1.6 a una longitud de onda de 540 nm para obtener aproximadamente 3×10^8 levaduras para posteriormente opsonizarlas con 2ml de suero humano fresco a 37°C por 20 min. Una vez opsonizadas, las levaduras fueron co-cultivadas con leucocitos provenientes de médula ósea (4×10^6) en una relación 1:1 con incubación de 20 min a 37°C, seguido de este paso las muestras fueron centrifugadas eliminando el sobrenadante para resuspenderlas y fijarlas con metanol. Una vez fijadas las muestras fueron teñidas con Wright para su posterior análisis al microscopio (Eclipse E400 Nikon, Japon). Para el análisis del índice fagocítico (IF) se leyeron 300 células fagocíticas por ensayo. El IF fue determinado por la cantidad de 2 o más levaduras fagocitadas sobre el número de células fagocíticas.

Activación de linfocitos

Una vez realizado el tratamiento con el vehículo o CasNa como anteriormente mencionamos, las células mononucleadas provenientes de médula ósea, bazo y timo fueron teñidas mediante anticuerpos para identificar la activación de las células. Para el caso de linfocitos B con anti-B220 marcado con Cy5, y para los linfocitos T con anti-CD3 marcado con PerCP y tanto linfocitos T como B se tiñeron con el marcador de activación el anti-CD69 el cual estaba marcado con PE. Los análisis de activación de linfocitos mediante la expresión de CD69 se realizaron en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA) con el software Pro v.5.1.1 BD (Becton Dickinson), de acuerdo a los manuales de procedimiento. Se adquirieron 50000 células por muestra para cada análisis.

Detección de citocinas

Para detectar las citocinas mediante la técnica de ELISA se obtuvo sangre fresca del plexo axilar de los ratones previamente tratados con o sin CasNa. Una vez obtenida la sangre de los ratones se centrifugó por 10 min a 1500 rpm, para obtener los sueros; posteriormente se evaluó la concentración de las citocinas respetando el protocolo del kit de ELISA para cada una de las citocinas. La lectura de las placas se realizó 450nm en un espectrofotómetro TECAN.

Para evaluar la concentración de citocinas en médula ósea se extrajeron los fémures de los ratones tratados o no con CasNa y se concentró un pool de fluido con 500ul de PBS de 4 fémures por condición.

Citocinas del linaje mieloide:

Factor estimulador de granulocitos y monocitos (GM-CSF)

Factor estimulador de monocitos (M-CSF)

Factor estimulador de granulocitos (G-CSF)

Trombopoyetina (EPO)

Eritropoyetina (EPO)

Citocinas del linaje linfoide:

Interleucina 2 (IL-2)

Interleucina 7 (IL-7)

Interleucina 15 (IL-15)

Análisis y estadística de datos

En el presente estudio los datos se presentaron como la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos de manera independiente. Para observar diferencias significativas (*) entre los datos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnet ($p < 0.05$) mediante el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS

EFFECTO DEL CasNa EN LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA, BAZO Y TIMO

El CasNa aumenta el número de células mononucleadas de médula ósea, bazo y timo *in vivo*.

En este trabajo se analizó el efecto del CasNa sobre la proliferación de linajes mieloides y linfoides tanto en médula ósea, bazo, cavidad peritoneal y timo *in vivo*. Para cumplir con el propósito se inyectó 1 ml de CasNa, 10% en PBS p/v en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c cada 48 h, posteriormente los ratones fueron sacrificados y tanto el fémur, el bazo, células de cavidad peritoneal y el timo fueron extraídos para obtener posteriormente células totales mononucleadas mediante gradiente de densidad para su posterior análisis.

En primer lugar se evaluó el número de células totales mononucleares obtenidas de médula ósea por fémur, por bazo y timo de ratón, y se encontró mayor cantidad en aquellos ratones inyectados con CasNa (Figura 5 A, B y C). Posteriormente se evaluó la viabilidad celular de éstas mediante azul tripano, encontrando altos porcentajes de viabilidad en las células mononucleadas de los tres órganos (Figura 5 D, E y F).

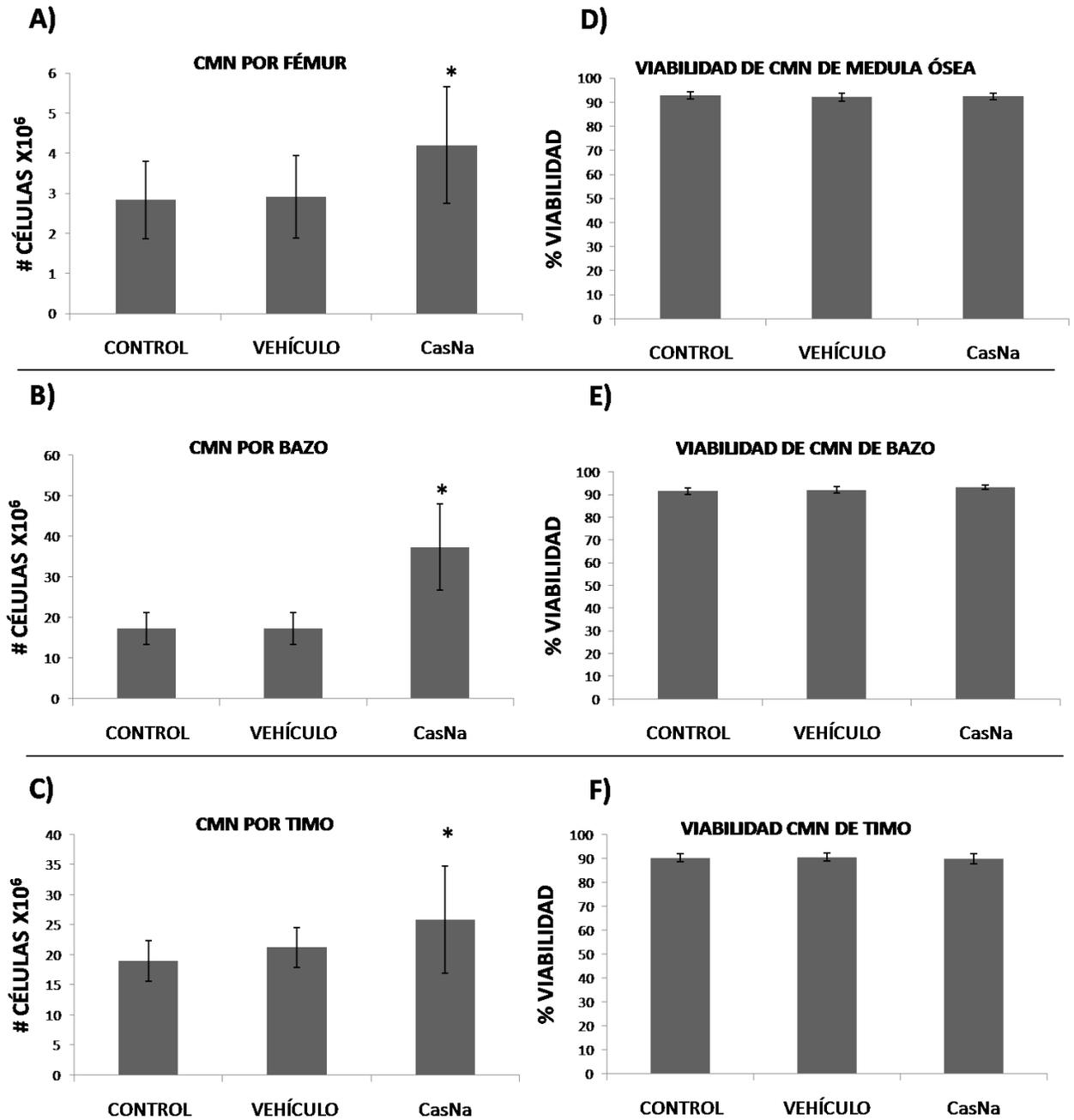


Figura 5.- Aumento del número de células mononucleadas de médula ósea (A), bazo (B) y timo (D) obtenidas de ratones control ó tratados intraperitonealmente con CasNa (1ml 10% PBS p/v) cada 48 h o con solo vehículo (1ml PBS), sin afectar su viabilidad (D, E y F respectivamente) [*Diferencia significativa con respecto al control y vehículo (P<0.05)].

El CasNa aumenta la proliferación de células mononucleadas de médula ósea y bazo.

Con la finalidad de establecer si el aumento en el número de células mononucleadas en los diferentes órganos se debía a un incremento en la proliferación, se evaluó el porcentaje de incorporación de BrdU, lo cual es indicativo de proliferación celular mediante citometría de flujo. Los datos obtenidos muestran que las CMN de médula ósea provenientes de ratones tratados con CasNa son capaces de incorporar casi el doble de BrdU comparados con las CMN provenientes de aquellos ratones que sólo recibieron el vehículo como tratamiento (34.86 ± 12.07 vs 18.99 ± 2.51) (Figura 6 A). En cuanto a las CMN de bazo, el CasNa induce un aumento de más del doble en los ratones tratados con CasNa (48.30 ± 22.71 vs 19.51 ± 16.42) (Figura 6 B). Finalmente, en tino al parecer los resultados no son tan favorecedores ya que el aumento no es significativo, sin embargo, si se observó un incremento de células mononucleadas en este órgano (Figura 6 C).

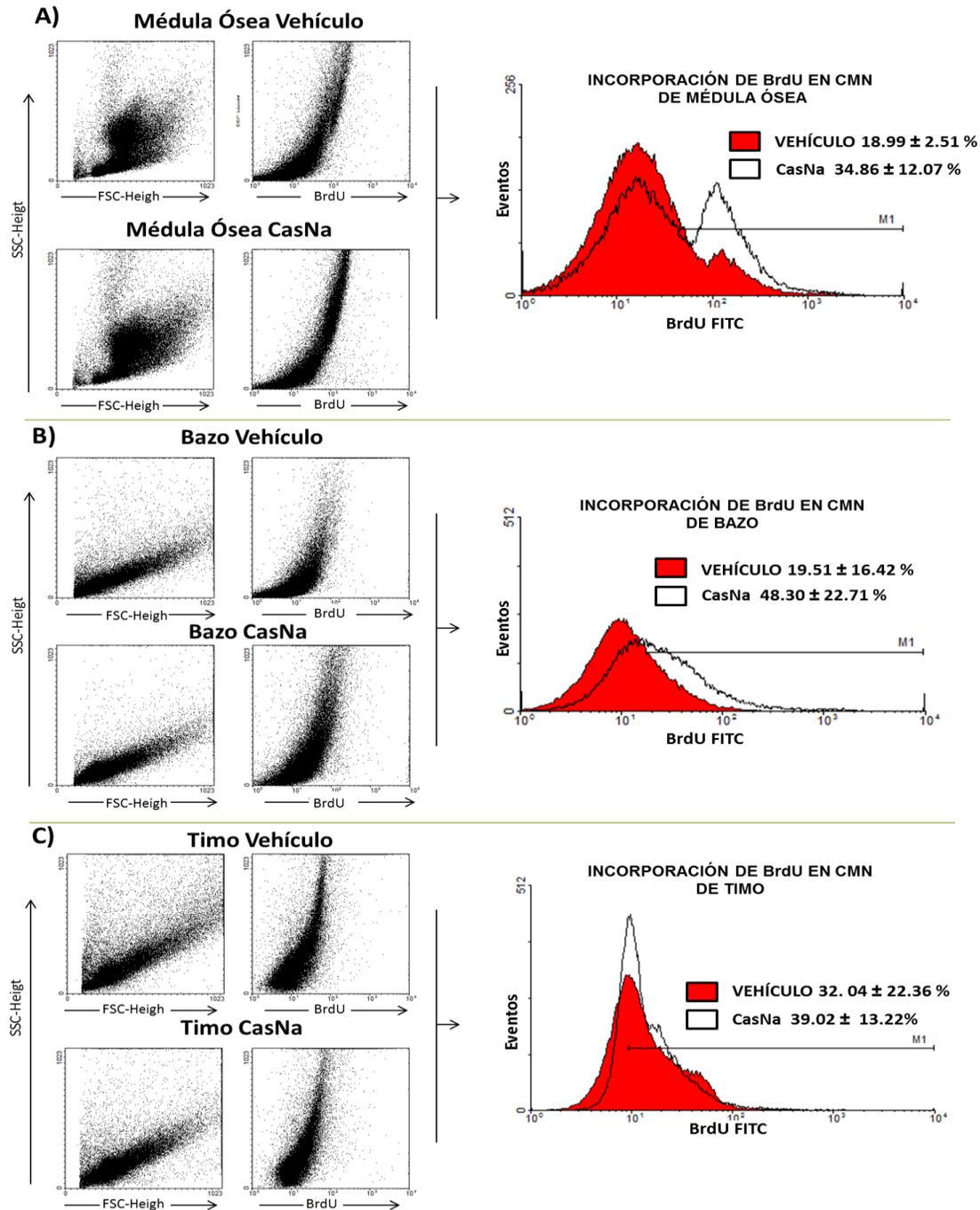


Figura 6.- El CasNa induce la proliferación de células mononucleadas de médula ósea (A) y bazo (B) y débilmente en timo (C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células (de la marca M1) \pm DS, se presentan dotplots e histogramas representativos de CMN de médula ósea, bazo y timo de 3 experimentos realizados de manera independiente.

EFEECTO DEL CasNa EN LA MIELOPOYESIS

El CasNa induce la proliferación del linaje granulocítico en médula ósea.

Después de observar que el CasNa es capaz de aumentar la incorporación de BrdU en las células mononucleadas principalmente en médula ósea y bazo, nos dispusimos a evaluar si bajo nuestras condiciones de tratamiento el CasNa tenía efecto sobre algún linaje en específico. Para este objetivo, evaluamos en primer lugar el linaje mielóide y en específico el linaje granulocítico en médula ósea. Antecedentes de otro grupo de investigadores donde se indica que la inoculación de 3 ml de CasNa intraperitoneal (10 % en PBS) en la cepa de ratones CD1, incrementa el número de mieloblastos en médula ósea a los 3 días de evaluación *in vivo* (Lord K, 1993). Para observar si bajo nuestro modelo de tratamiento el CasNa también aumentaba el número de precursores mieloides evaluamos las células mononucleadas provenientes de la médula ósea de ratones BALB/c de ratones BALB/c mediante morfología celular, los resultados obtenidos mostraron que, existe un incremento significativo en el porcentaje de mieloblastos (8.20 ± 2 vs 4.90 ± 0.5) y células en banda ($31.47 \pm 5.7^*$ vs 23.1 ± 4.7), mientras que la población de promielocitos, mielocitos, metamielocitos y segmentados no se ven alteradas. Estos resultados al parecer concuerdan con lo observado por el grupo de Lord K. (Lord K, 1993). Por otro lado, observamos que la población de linfocitos se ve disminuida en casi la mitad bajo nuestro esquema de tratamiento. (Figura 7).

MORFOLOGÍA DE CÉLULAS EN MÉDULA ÓSEA

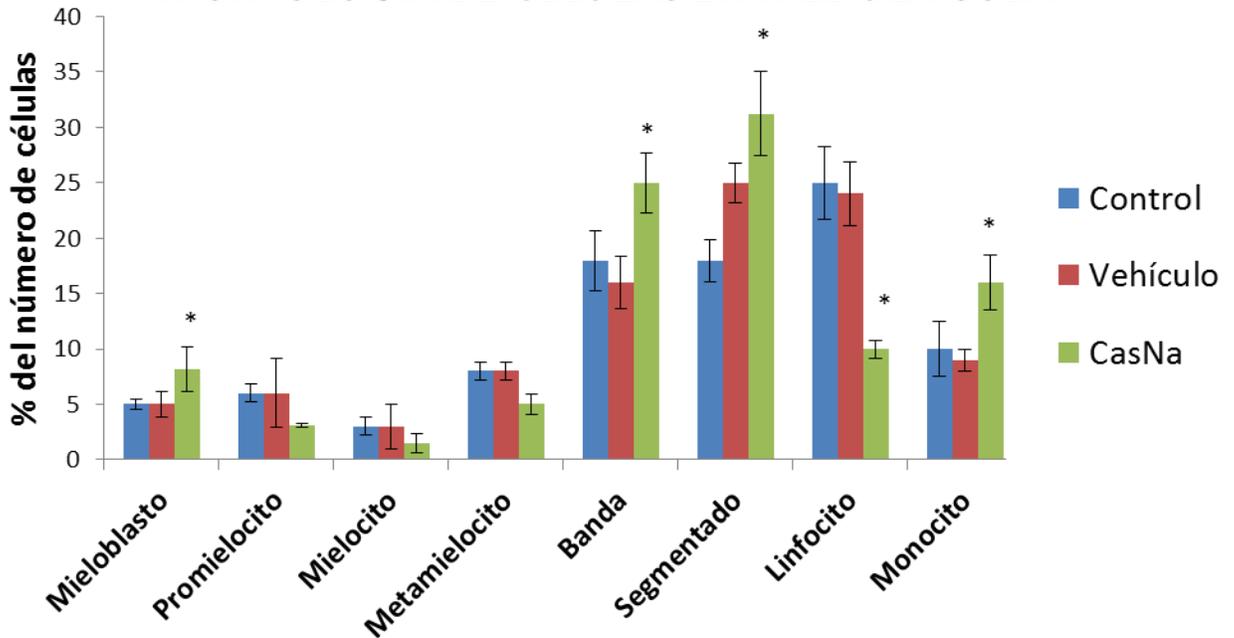


Figura 7.- El CasNa aumenta el número de células del linaje mieloide (mieloblastos, células en banda, granulocitos segmentados y monocitos), por otro lado disminuye considerablemente el número de linfocitos en médula ósea. En la grafica se observa un aumento del número de células mieloides provenientes de médula ósea de ratones control, tratados con solo vehículo (1ml) o CasNa (1ml/10%), evaluadas en citospin mediante morfología y tinción de Wright contando 300 células. Células maduras = neutrófilos segmentados; precursores intermedios = mielocitos, metamielocitos y células en banda; células precursoras tempranas = mieloblastos, promielocitos. (*Diferencia significativa con respecto al control y vehículo ($P < 0.05$) determinado mediante la prueba de Dunnet).

Los datos anteriores sugieren que el incremento en el número de células de la serie granulocítica podría deberse a una posible inducción en la proliferación de este linaje. Por lo tanto, para identificar la proliferación del linaje granulocítico, evaluamos mediante citometría de flujo en base a los parámetros de granularidad y tamaño para este linaje, e identificación del antígeno de linaje específico (Ly-6G) (Gr-1) así como la evaluación de incorporación de BrdU, el cual nos indicaría un evento de proliferación. Los resultados obtenidos muestran en primer lugar que en el total de células mononucleadas y bajo nuestras condiciones de tratamiento el CasNa es capaz de incrementar el número de eventos de la región correspondiente al linaje granulocítico, cuando son comparados con aquellos ratones que solo reciben vehículo como tratamiento (30.5 ± 3.10 vs 45.5 ± 2.62 respectivamente) (Figura 8 A y B). Así mismo al evaluar en esta región el porcentaje de incorporación de BrdU, observamos que el tratamiento también fue capaz de aumentar en casi el doble este parámetro, indicando así que la proliferación del linaje granulocítico es incrementada tras la inoculación intraperitoneal de CasNa cuando es comparada con los ratones tratados con solo vehículo (64.94 ± 34.14 vs 38.35 ± 10.88 respectivamente) (Figura 8 C).

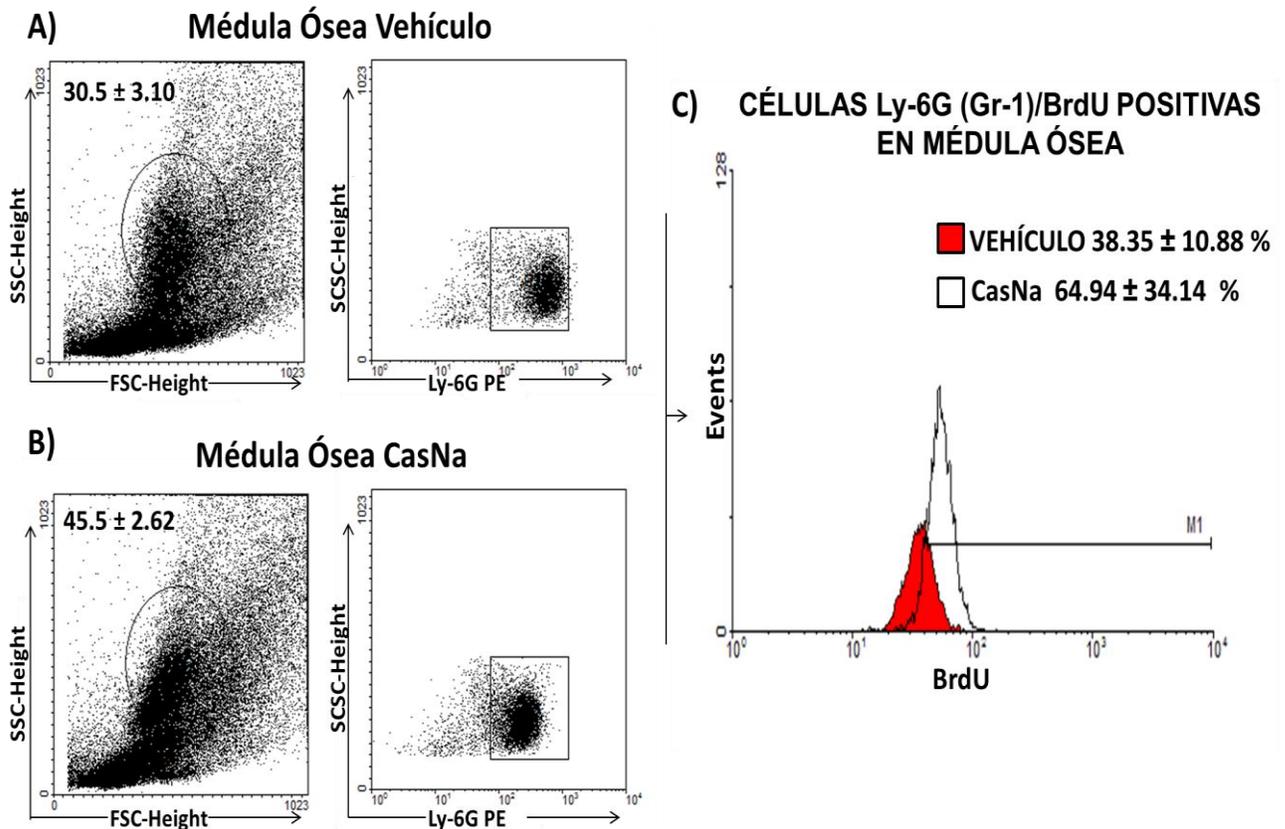


Figura 8.- El tratamiento IP con CasNa aumenta el porcentaje de células correspondientes al linaje granulocítico en médula ósea e incrementa el porcentaje de incorporación de BrdU en este linaje. Se presentan doplot's representativos de células mononucleadas totales provenientes de ratones tratados con solo vehículo o CasNa. Selección mediante granularidad y tamaño de la región correspondiente al linaje granulocítico y positividad al anticuerpo anti Ly-6G (Gr-1) de células seleccionadas previamente de la región correspondiente a granulocitos (Fig. A,B). Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células Gr-1 positivas provenientes de ratones de CMN de médula ósea tratados con vehículo o CasNa (Fig. C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células (de la marca M1) \pm DS. La estadística presentada es correspondiente de al menos 3 experimentos realizados de manera independiente con una "n" de 3 ratones cada uno.

Una vez que determinamos que la inoculación de CasNa es capaz de inducir proliferación en el linaje granulocítico, nos dispusimos a evaluar si el tratamiento era capaz de inducir el incremento en la concentración de citocinas involucradas en la granulopoyesis, como el G-CSF y el GM-CSF, los cuales son factores estimuladores clave de este linaje. Los resultados muestran que tras la evaluación de estas citocinas en el suero y médula ósea de ratones tratados mediante la técnica de ELISA, observamos que existe un incremento en la concentración de los niveles de G-CSF tanto en médula ósea como en suero. En cuanto al GM-CSF, se observó que en suero los niveles pasan de ser no detectados a ser detectados y en médula ósea no se observa un cambio considerable de esta citocina (Tabla 1).

| Tratamiento | Citocina (pg/mL) | | | |
|-------------|------------------|------------|--------------|-------------|
| | G-CSF | | GM-CSF | |
| | Suero | M.O | Suero | M.O |
| Control | 126 ± 48 | 118 ± 70 | ND | 0.86 ± 0.02 |
| Vehículo | 974 ± 411 | 106 ± 19 | ND | 0.75 ± 0.02 |
| CasNa | 3189 ± 350* | 1160 ± 24* | 1.25 ± 1.13* | 0.85 ± 0.01 |

Tabla 1.- El tratamiento IP con CasNa incrementa los niveles de G-CSF y GM-CSF en suero y médula ósea. Determinación de los niveles de concentración de Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas (G-CSF) y Factor Estimulador de Colonias Granulocito-Monocito (GM-CSF) mediante técnica de ELISA, en sueros y médula ósea provenientes de ratones BALB/c, control, tratados con solo vehículo (1ml PBS) o CasNa (1ml/10%). ND, no detectada (*Diferencia significativa con respecto al control y vehículo (P<0.05)).

El CasNa aumenta el índice fagocítico de los granulocitos en médula ósea

Después de observar que el CasNa incrementa la proliferación de células del linaje granulocítico, incluyendo aumento en el porcentaje de mieloblastos y células en banda y granulocitos segmentados, se evaluó si estas células eran funcionales mediante la medición de su capacidad fagocítica. Los ensayos de capacidad fagocítica revelan que las células provenientes de ratones tratados con CasNa tienen un mayor índice fagocítico (0.6 ± 0.1 vs 0.06 ± 0.03) (Figura 9), lo cual sugiere que el tratamiento con CasNa en primer lugar no afecta la funcionalidad de estas células y que inclusive aumenta su capacidad fagocítica, evento de gran importancia dentro de la respuesta inmune innata.

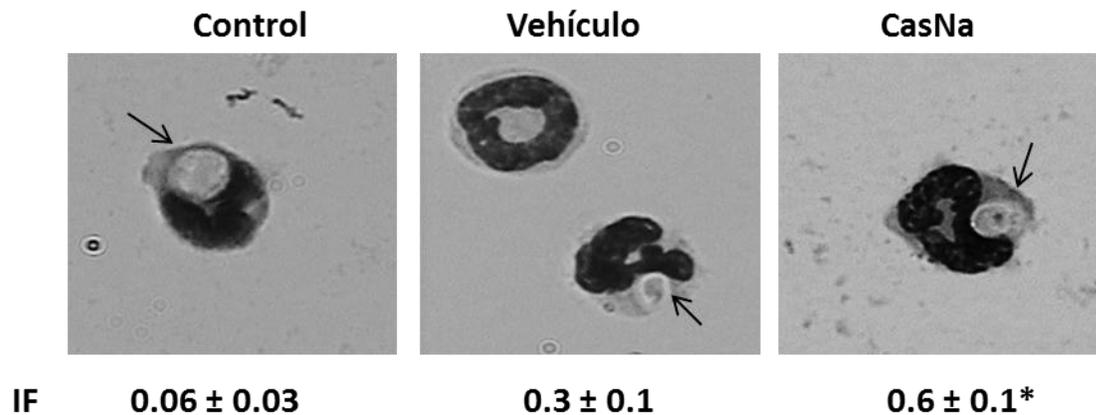


Figura 9.- El tratamiento con CasNa aumenta el índice fagocítico en el linaje granulocítico en médula ósea. Evaluación del índice fagocítico (IF) mediante la identificación morfológica de células granulocíticas provenientes de CMN de médula ósea de ratones control y tratados con vehículo o con 1ml al 10% de CasNa cada 48 h. Levaduras *C. albicans* (flechas). *Diferencia significativa con respecto al control y vehículo ($P < 0.05$) determinado mediante la prueba de Dunnet.

El CasNa aumenta la proliferación de células del linaje monocito-macrófago en médula ósea

Después de determinar que el CasNa ejerce un efecto sobre la proliferación y activación del linaje granulocítico, nos dispusimos a evaluar si el linaje monocito-macrófago también era influenciado bajo nuestro modelo de tratamiento. Para cubrir este objetivo evaluamos el linaje monocito-macrófago apoyándonos en base a su granularidad y tamaño para identificar la región correspondiente de las células monocíticas. Posteriormente, evaluamos la tinción con el anticuerpo específico para este linaje CD11b/MAC-1 (MAC-1) y el porcentaje de incorporación de BrdU en estas células. Los resultados obtenidos muestran que el número de eventos es ligeramente menor en médula ósea de ratones tratados con CasNa en la región correspondiente al linaje monocítico comparado con los controles que solo reciben vehículo como tratamiento (14.33 ± 1.52 vs 13.3 ± 1.7 respectivamente) (Figura 10 A, B). Observamos también que estas células tienen la capacidad de incorporar un mayor porcentaje de BrdU comparado con las muestras obtenidas en ratones tratados solo con vehículo, (73.86 ± 25.20 vs 40.27 ± 26.80) (Figura 10 C). Finalmente creemos que bajo nuestro esquema de tratamiento se induce la proliferación de este linaje, creando así la posibilidad de que quizás la disminución del número de células se deba a que este linaje migra hacia el sitio de inoculación dando cabida a que se favorezca la granulopoyesis, principalmente en médula ósea.

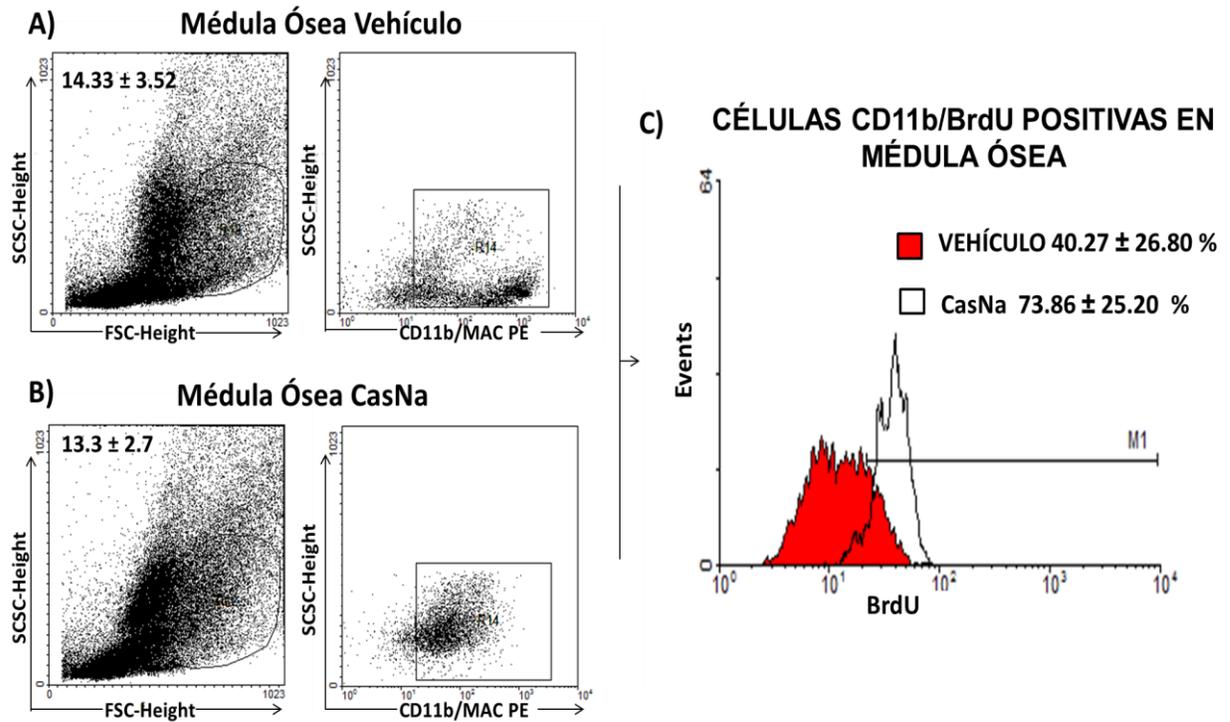


Figura 10.- El tratamiento IP con CasNa aumenta el porcentaje de células correspondientes al linaje monocito-macrófago en médula e incrementa el porcentaje de incorporación de BrdU en este linaje. Se presentan dotplots representativos de células mononucleadas totales provenientes de ratones tratados con solo vehículo o CasNa. Selección mediante granularidad y tamaño de la región correspondiente al linaje monocito-macrófago y positividad al anticuerpo anti CD11b de células seleccionadas (Fig. A,B). Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células CD11b positivas provenientes de ratones de CMN de médula ósea tratados o no con CasNa (Fig. C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células (de la marca M1) ± DS. La estadística presentada es el promedio de al menos 3 experimentos realizados de manera independiente con una n de 3 ratones cada uno.

Posteriormente tomando en consideración que el tratamiento con CasNa induce la monocitopoyesis y que también incrementa los niveles de GM-CSF, evaluamos si el M-CSF, el cual es una citocina clave para la monocitopoyesis, se incrementa en el suero de los ratones tratados con CasNa. Los resultados obtenidos muestran que bajo nuestras condiciones de tratamiento el M-CSF pasa de ser no detectado en los ratones control y con vehículo a ser detectado en aquellos sueros de ratones tratados con CasNa, indicando así que también este factor es regulado bajo nuestro modelo de tratamiento (Tabla 2).

| Tratamiento | Citocina (pg/mL) |
|-------------|------------------|
| | M-CSF |
| Control | ND |
| Vehículo | 845±149 |
| CasNa | 1490±17* |

Tabla 2.- El tratamiento IP con CasNa incrementa los niveles de M-CSF en suero. Determinación de los niveles de concentración de Factor Estimulador de Colonias Monocito-macrófago (M-CSF) mediante técnica de ELISA en sueros provenientes de ratones BALB/c control, tratados sólo con vehículo (1ml PBS) o CasNa (1ml/10%). ND, no detectada. *Diferencia significativa con respecto al control y vehículo (P<0.05).

El CasNa aumenta el índice fagocítico de los monocitos en médula ósea

Con el fin de establecer si también las células monocíticas eran funcionales al igual que los granulocitos, evaluamos su capacidad fagocítica. Los resultados muestran que los monocitos provenientes de la médula ósea de ratones tratados con CasNa aumentan su índice fagocítico cuando son comparados con aquellos monocitos provenientes de la medula ósea de ratones controles, determinando así que al igual que los granulocitos, los monocitos no pierden su funcionalidad y por el contrario incrementan su capacidad fagocita (Figura 11).

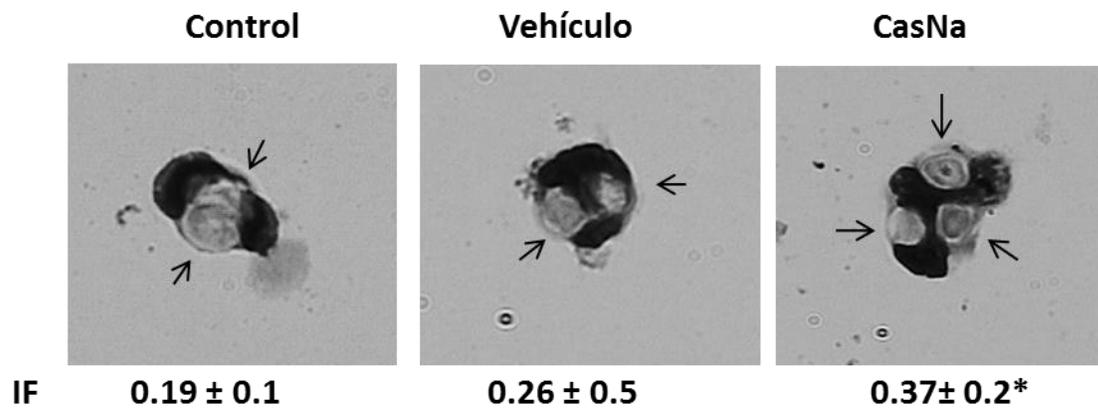


Figura 11.- El tratamiento con CasNa aumenta el índice fagocítico en el linaje monocítico. Evaluación del índice fagocítico (IF) mediante la identificación morfológica de células granulocíticas provenientes de CMN de médula ósea de ratones tratados o no vía intraperitoneal con 1 ml al 10% de CasNa cada 48 h. Levaduras *C. albicans* (flechas). *Diferencia significativa con respecto al control y vehículo ($P < 0.05$) determinado mediante la prueba de Dunnet.

El CasNa aumenta el número de monocitos que incorporan BrdU en cavidad peritoneal

En base a los resultados obtenidos en cuanto a la disminución en el número de monocitos en médula ósea y con el antecedente de que la caseína o el CasNa inducen la migración tanto de granulocitos como de monocitos al sitio de inoculación, evaluamos si bajo nuestro modelo de tratamiento el CasNa aumentaba el número de monocitos en cavidad peritoneal. Los resultados muestran que la inoculación de CasNa induce principalmente un aumento en el número de células monocíticas (Figura 12 A, B) y también eleva el porcentaje de incorporación de BrdU en estas células (8.28 ± 1.02 vs 4.56 ± 2.03) (Figura 12 C). Reforzando así la idea de que ante un evento de inflamación inducido por el CasNa en cavidad peritoneal, los monocitos generados en médula ósea migran al sitio de inoculación, favoreciendo así, la granulopoyesis mediada por el tratamiento con CasNa.

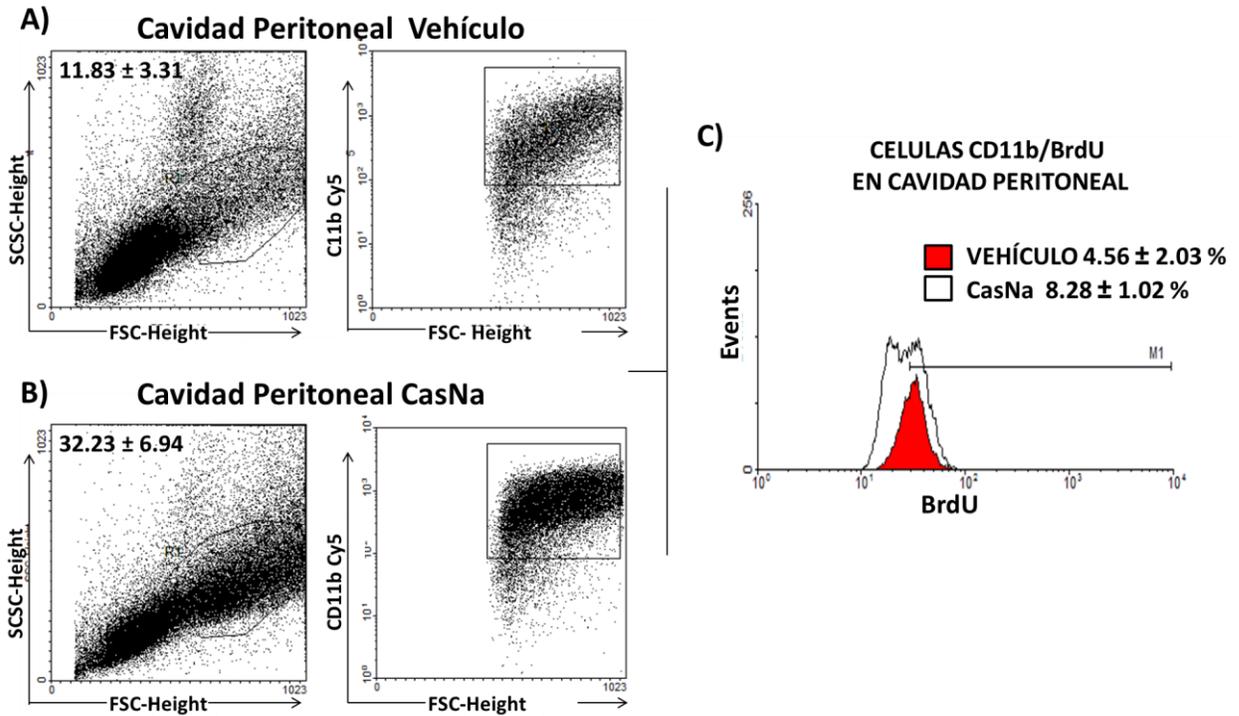


Figura 12.- El tratamiento IP con CasNa aumenta el porcentaje de células monocíticas en cavidad peritoneal e incrementa el porcentaje de incorporación de BrdU. Se presentan dotplots representativos de células mononucleadas totales provenientes de ratones tratados solo con vehículo o CasNa. Selección mediante granularidad y tamaño de la región correspondiente al linaje monocítico y positividad al anticuerpo anti CD11b (Fig. A,B). Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células CD11b positivas provenientes de ratones de CMN de médula ósea tratados o no con CasNa (Fig. C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células (de la marca M1) \pm DS. La estadística es el promedio de al menos 3 experimentos realizados de manera independiente con una n de 3 ratones cada uno.

El CasNa no aumenta la proliferación de precursores eritroides pero incrementa la concentración de Eritropoyetina (EPO)

Evidencia previa indica que, la caseína induce un incremento *in vitro* de eritrocitos provenientes de ratones previamente alimentados con esta proteína, además de aumentar los niveles de Eritropoyetina en suero de estos ratones (Okano, 1992). Con el fin de evaluar si bajo nuestro modelo de estudio el CasNa era capaz de inducir la proliferación del linaje eritroide *in vivo*, evaluamos la incorporación de BrdU en precursores eritroides en la médula ósea. Al igual que los linajes anteriores, nos apoyamos en base a la granularidad y tamaño de eritroblastos los cuales son capaces de incorporar BrdU y que son positivos al anticuerpo específico de linaje TER-119. Los resultados muestran que el tratamiento con CasNa no incrementa el número de células correspondiente a la región de eritroblastos (18.03 ± 1.31 vs 14.66 ± 1.15 respectivamente) (Figura 13 A,B), inclusive se observa una disminución en la incorporación de BrdU en el linaje eritroide en los ratones tratados con CasNa al ser comparados con los ratones que solo recibieron el vehículo como tratamiento (74.47 ± 24.76 vs 59.37 ± 15.80 respectivamente) (Figura 13 C). Sin embargo, al evaluar la concentración de eritropoyetina en suero, encontramos un incremento en la concentración de ésta en los ratones tratados con CasNa cuando son comparados con aquellos ratones control que sólo recibieron vehículo como tratamiento (Tabla 3).

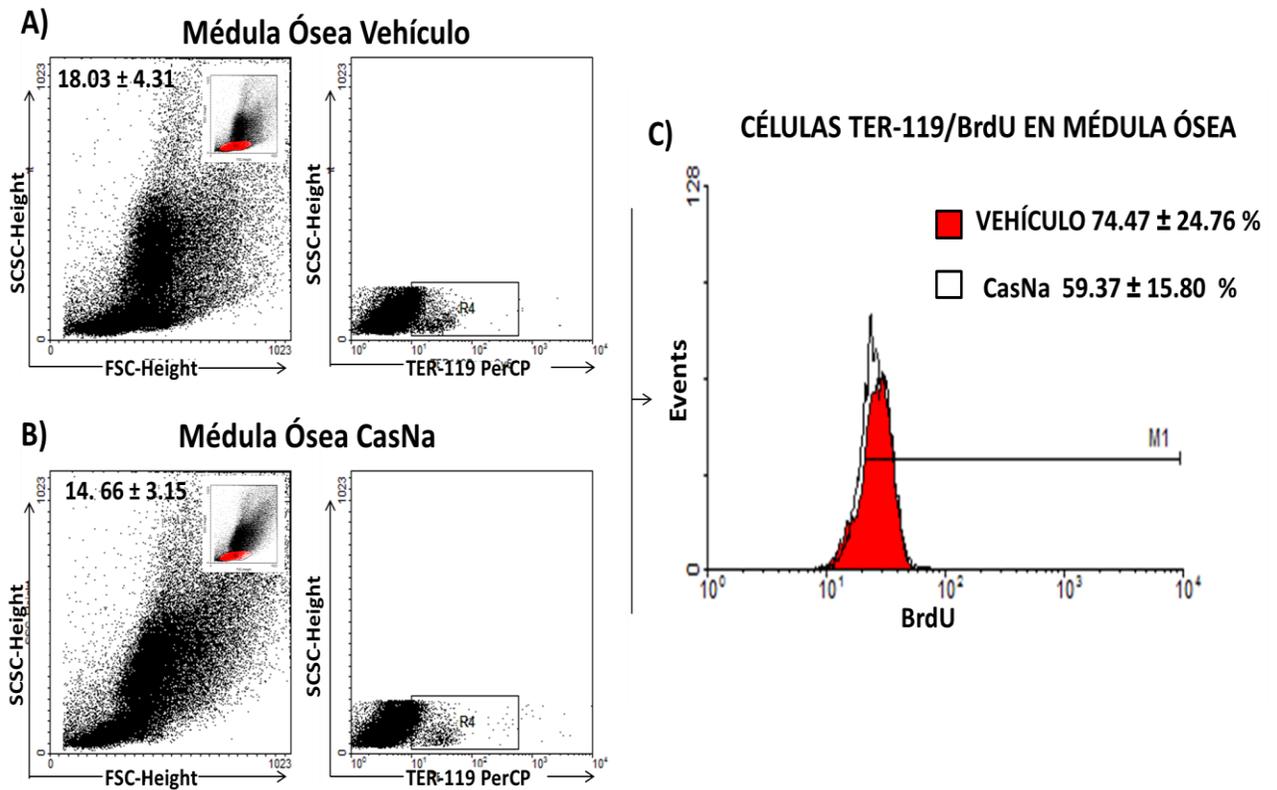


Figura 13.- El tratamiento IP con CasNa no induce la proliferación del linaje eritroide en médula ósea. Se presentan doplot's representativos de células mononucleadas totales provenientes de ratones tratados con solo vehículo o CasNa. Selección mediante granularidad y tamaño de la región correspondiente al linaje eritroide y positividad al anticuerpo anti TER-119 de células seleccionadas (Fig. A,B). Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células TER-119 positivas provenientes de CMN de médula ósea de ratones tratados o no con CasNa (Fig. C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células (de la marca M1) \pm DS. La estadística es el promedio de al menos 3 experimentos realizados de manera independiente con una n de 3 ratones cada uno.

| Tratamiento | Citocina(pg/mL) |
|-------------|-----------------|
| | EPO |
| Control | 35,13±10,53 |
| Vehículo | 90,12±21,60 |
| CasNa | 339,12±69,60* |

Tabla 3.- El tratamiento IP con CasNa incrementa los niveles de EPO en suero. Determinación de los niveles de concentración de eritropoyetina (EPO) mediante técnica de ELISA en sueros provenientes de ratones Balb/c control, tratados sólo con vehículo (1ml PBS) o CasNa (1ml/10%). ND, no detectada. *Diferencia significativa con respecto al control y vehículo (P<0.05).

El CasNa no aumenta la incorporación de BrdU en precursores megacariocíticos pero incrementa la concentración de trombopoyetina

Una vez evaluado el linaje granulocítico, monocítico y eritroide nos dispusimos a observar si el tratamiento con CasNa tenía efecto sobre el linaje megacariocítico, por lo tanto, evaluamos si los megacariocitos de ratones tratados con CasNa aumentaban la incorporación de BrdU en médula ósea. Para identificar el linaje megacariocítico nos apoyamos nuevamente en base a la granularidad y tamaño de estas células, para posteriormente evaluar la tinción con el anticuerpo específico de linaje CD41. Los resultados demuestran que bajo nuestras condiciones de tratamiento, no aumenta el número de células correspondiente al linaje megacariocítico (15.86 ± 1.81 vs 13.24 ± 1.15 respectivamente (Figura 14 A,B) así como la incorporación de BrdU (54.24 ± 3.86 vs 56.90 ± 4.45) (Figura 14 C). Sin embargo, al evaluar si el CasNa inducía un aumento en la concentración de trombopoyetina encontramos que el tratamiento aumenta ligeramente la concentración de ésta en el suero de los ratones tratados con CasNa comparados con los que sólo reciben vehículo como tratamiento (Tabla 4).

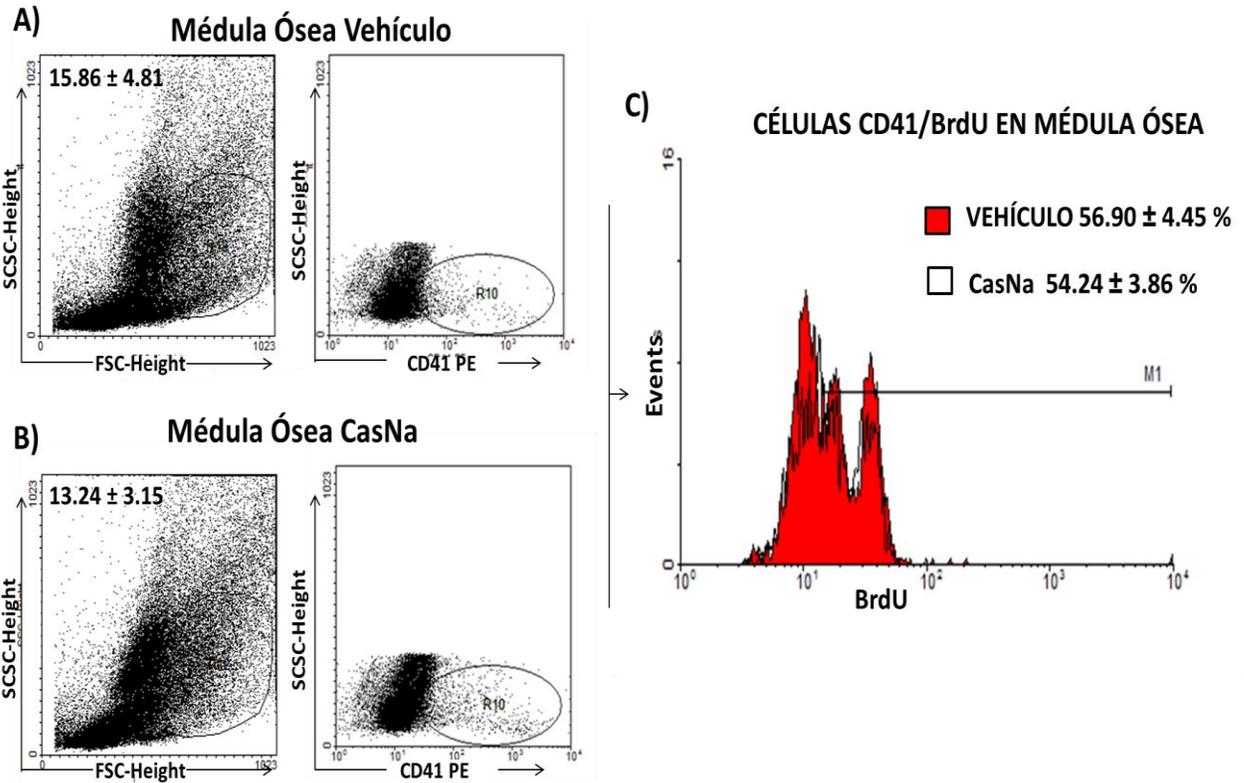


Figura 14.- El tratamiento IP con CasNa no induce la proliferación del linaje megacariocítico. Se presentan doplot's representativos de células mononucleadas totales provenientes de ratones tratados con solo vehículo o CasNa. Selección mediante granularidad y tamaño de la región correspondiente al linaje megacariocítico y positividad al anticuerpo anti CD41 (Fig. A,B). Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células Gr-1 positivas provenientes de ratones de CMN de médula ósea tratados o no con CasNa (Fig. C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células \pm DS (de la marca M1). La estadística es el promedio de al menos 3 experimentos realizados de manera independiente con una n de 3 ratones cada uno.

| Tratamiento | Citocina(pg/mL) |
|-------------|-----------------|
| | TPO |
| Control | 1486,55±175,18 |
| Vehículo | 1508,15±264,90 |
| CasNa | 2080,55±114,49* |

Tabla 4.- El tratamiento IP con CasNa incrementa los niveles de TPO en suero. Determinación de los niveles de concentración de Trombopoyetina (TPO) mediante técnica de ELISA, en sueros provenientes de ratones Balb/c control, tratados sólo con vehículo (1ml PBS) o CasNa (1ml/10%). ND, no detectada. *Diferencia significativa con respecto al control y vehículo (P<0.05).

EFEECTO DEL CASNA EN CÉLULAS LINFOIDES

El CasNa aumenta la incorporación de BrdU en linfocitos B en bazo

Una vez evaluado el efecto del CasNa sobre la mielopoyesis nos dispusimos a observar si bajo nuestro modelo de tratamiento éste también podía tener algún efecto en la linfopoyesis. Existe evidencia *in vitro* de que péptidos de caseína son capaces de inducir el aumento en el número de células T y B (Wong, 1996), sin embargo, al parecer estos antecedentes no son muy claros y consistentes por lo que evaluamos si el CasNa induce la proliferación del linaje linfoide *in vivo* mediante la incorporación de BrdU tanto en médula ósea como en timo y bazo. Existe evidencia de que, agentes pro-inflamatorios inducen la proliferación del linaje granulocítico en médula ósea disminuyendo la proliferación del linaje de linfocitos B (Ueda, 2004, 2005). Considerando que el CasNa ha sido utilizado como agente proinflamatorio (Metcalf, 1995; Lotem and Sachs, 1985) nos dispusimos observar si se mantenía el mismo efecto bajo nuestro esquema de tratamiento. En primer lugar, nos dispusimos a evaluar si el linaje de células B se veía influenciado por el CasNa por lo que para identificar el linaje linfoide mediante citometría de flujo nos apoyamos en base a la granularidad y tamaño de los linfocitos, para posteriormente evaluar la tinción positiva al anticuerpo anti-B220, específico de linaje B. Los resultados muestran que el número de linfocitos en médula ósea se ve disminuido en los ratones tratados con CasNa comparados con los ratones que reciben sólo vehículo (18.66 ± 2.08 vs 11.33 ± 1.15) (Figura 15 A, B), coincidiendo este efecto con lo observado por el grupo de Ueda. También, observamos que el porcentaje de incorporación de BrdU se ve disminuido en los linfocitos B de médula ósea (50.33 ± 4.50 vs 32.03 ± 2.64) (Figura 15 C). Sin embargo, se sabe que en ratón, el bazo puede ser un órgano hematopoyético secundario (Bertrand, 2006; Cyster, 2005, fu, 1999), por lo que evaluamos si en este órgano el CasNa tenía algún efecto en el linaje linfoide. Nuestros resultados muestran, en primer lugar, que el número de células correspondiente a la región de linfocitos se ve aumentado cuando comparamos con ratones que recibieron CasNa contra aquellos que solo recibieron vehículo

como tratamiento (89.01 ± 1.03 vs 75.66 ± 2.08 respectivamente) (Figura 16 A, B). Así mismo, también observamos un incremento en la incorporación de BrdU en células B220 positivas, indicando que el tratamiento con CasNa al parecer induce la proliferación de linfocitos B en médula ósea (38.59 ± 4.48 vs 11.82 ± 1.04) (Figura 16 C).

Una vez observado el efecto del CasNa sobre linfocitos B en bazo, evaluamos si el CasNa influía también el linaje de células T. Los resultados obtenidos no son concluyentes y son contradictorios con lo observado en la incorporación de BrdU, ya que si bien encontramos un aumento en el número de células, no encontramos un incremento en el porcentaje de BrdU, esto debido quizás a que los anticuerpos utilizados para este análisis dejaban ver solo estadios más diferenciados del linaje y no aquellas células con mayor capacidad de incorporar el BrdU, por lo que es necesario ampliar el estudio utilizando anticuerpos que detecten células con capacidad de proliferar en el linaje T como lo son los linfocitos doble negativos.

Una vez observado el efecto del CasNa en la proliferación del linaje linfoide evaluamos también si el tratamiento con CasNa era capaz de incrementar los niveles de la concentración de citocinas clave para la linfopoyesis tanto de B como de T como lo son la IL-2, IL-7 e IL-15. Los resultados muestran que la concentración de las tres interleucinas aumenta considerablemente en el suero de los ratones tratados con CasNa comparados con los que sólo reciben vehículo como tratamiento (Tabla 5).

Finalmente evaluamos si el CasNa era capaz de activar tanto a las células B como a los linfocitos T, mediante la expresión de CD69, una molécula co-estimuladora que aumenta su expresión en la activación de linfocitos B y T (Vazquez BN, 2009; Ciabattini A, 2008). Estos resultados muestran que al parecer el CasNa no es capaz de activar a los linfocitos B tanto en bazo como en médula ósea (Fig. 17 A y B) y los linfocitos T en timo (Fig. 17 C y D).

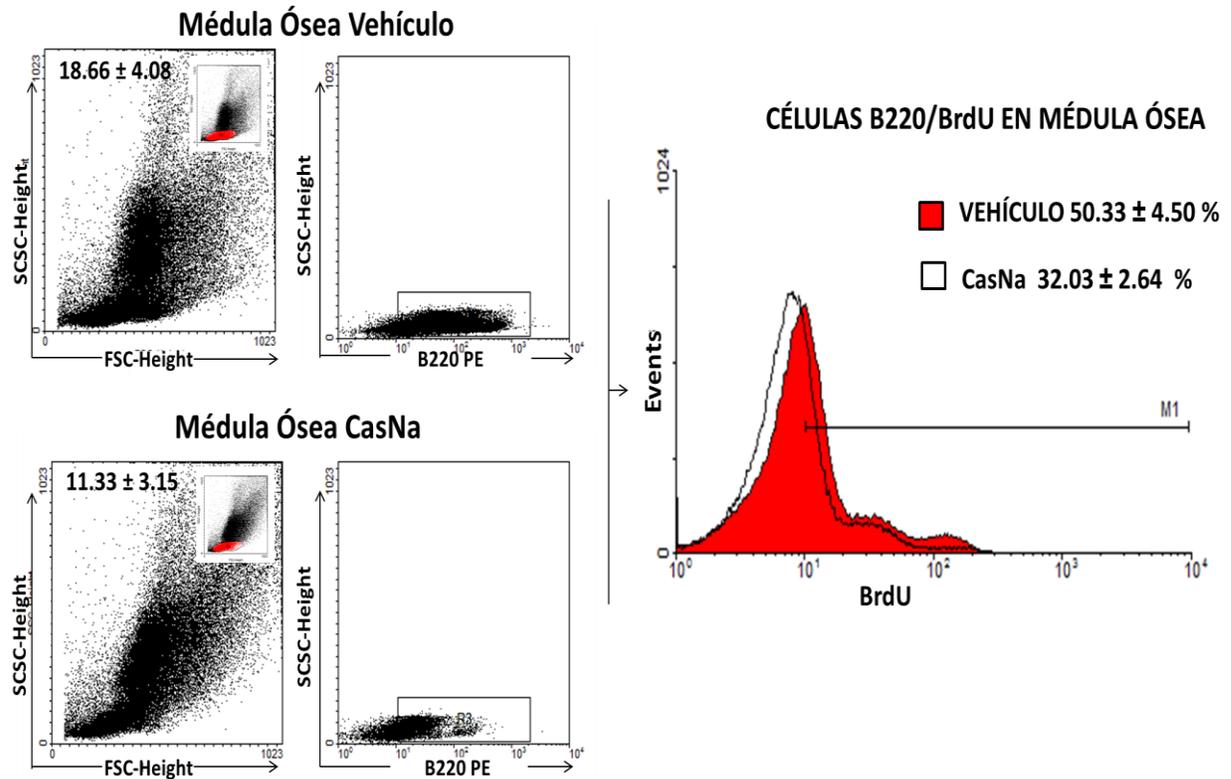


Figura 15.- El tratamiento IP con CasNa disminuye el porcentaje de células correspondientes al linaje linfocítico en médula ósea así como la incorporación de BrdU. Se presentan dotplots representativos de células mononucleadas totales provenientes de ratones tratados con solo vehículo o CasNa. Selección mediante granularidad y tamaño de la región correspondiente al linaje linfocítico y positividad al anticuerpo anti B220 (Fig. A,B). Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células B220 positivas provenientes de ratones de CMN de médula ósea tratados o no con CasNa (Fig. C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células (de la marca M1) ± DS. La estadística es el promedio de al menos 3 experimentos realizados de manera independiente con una n de 3 ratones cada uno.

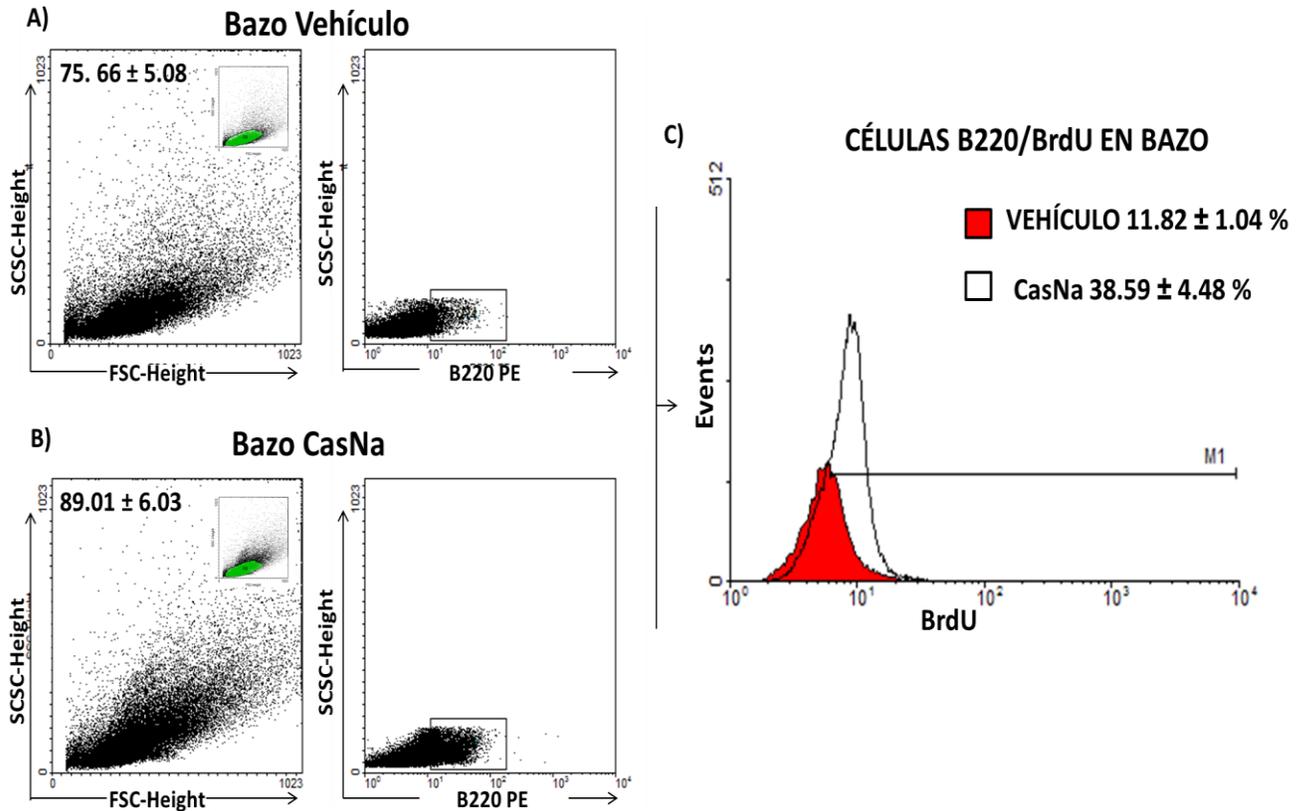


Figura 16.- El tratamiento IP con CasNa aumenta el porcentaje de células correspondientes al linaje linfóide en Bazo así como la incorporación de BrdU. Se presentan dotplots representativos de células mononucleadas totales provenientes de ratones tratados con solo vehículo o CasNa. Selección mediante granularidad y tamaño de la región correspondiente al linaje linfóide y positividad al anticuerpo anti B220 (Fig. A,B). Evaluación del porcentaje de incorporación de BrdU en células B220 positivas provenientes de ratones de CMN de médula ósea tratados o no con CasNa (Fig. C). Los números representan el porcentaje de BrdU incorporado en las células \pm DS (de la marca M1). La estadística es el promedio de al menos 3 experimentos realizados de manera independiente con una n de 3 ratones cada uno.

| Tratamiento | Citocina (pg/mL) | | |
|-------------|------------------|-----------|-----------|
| | IL-2 | IL-7 | IL-15 |
| Control | 0.66 ± 0.49 | ND | ND |
| Vehículo | 0.87 ± 0.46 | ND | ND |
| CasNa | 5.72 ± 1.10 | 29 ± 9.42 | 53 ± 7.07 |

Tabla 5.- Determinación de los niveles de concentración de Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 7 (L-7), mediante técnica de ELISA en sueros provenientes de ratones BALB/c control, tratados con sólo vehículo (1ml PBS) o CasNa (1ml/10%). ND, no detectada. *Diferencia significativa con respecto al control y vehículo (P<0.05).

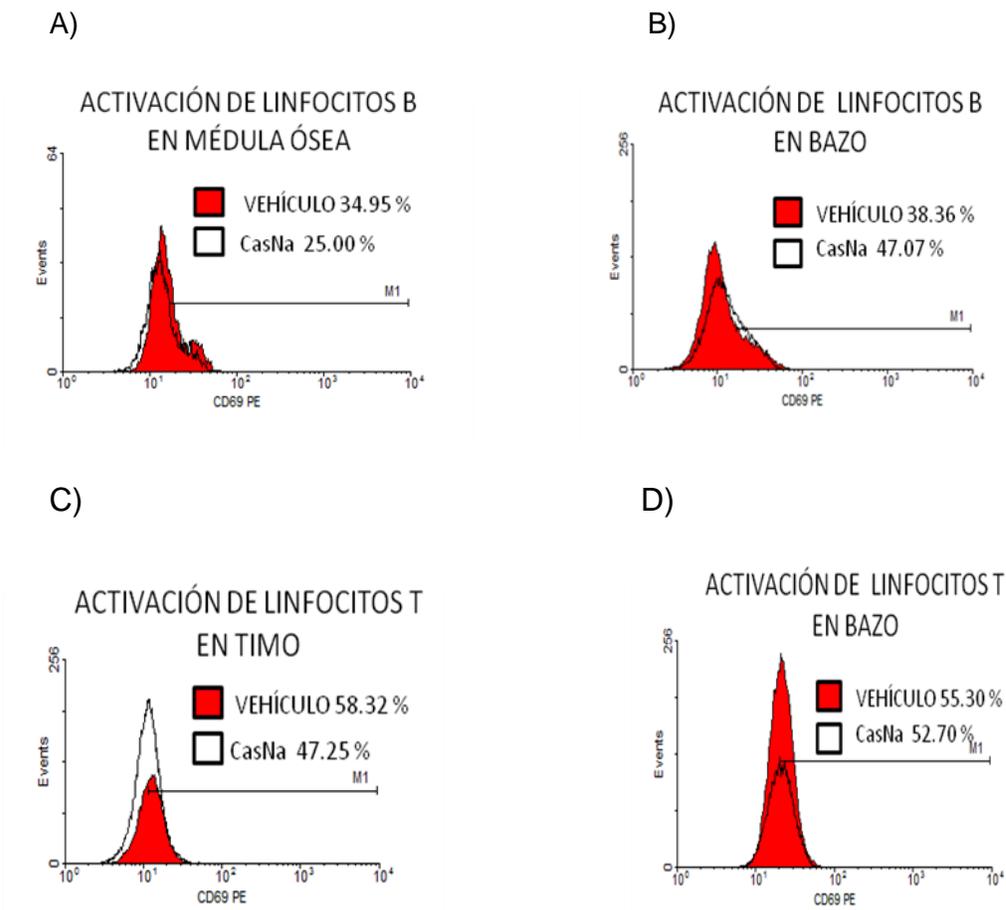


Figura 17.-. El tratamiento con CasNa no induce la activación del linaje T y B tanto en médula ósea, bazo y timo. Evaluación del porcentaje de expresión del antígeno CD69 en linfocitos B B220 positivos en médula ósea (A) y bazo (B) y en linfocitos T CD3 positivas en timo (C) y bazo (D) previamente seleccionadas mediante granularidad, tamaño y positividad a los anticuerpos correspondientes provenientes de ratones tratados con (CasNa) 1ml/10% vía intraperitoneal cada 48h por 7 días (color negro/blanco), o sólo vehículo (color rojo/negro). Los números representan el porcentaje de positividad a CD69 en las células (de la marca M1).

DISCUSIÓN

El caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína, la principal proteína de la leche, ha sido utilizado desde hace 20 años como una molécula capaz de inducir inflamación cuando es inoculado en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (Metcalf, 1996; Lotem and Sachs, 1983). Se ha demostrado que tras la inoculación intraperitoneal de CasNa o caseína, existe una migración de granulocitos principalmente, e incrementando posteriormente el número de monocitos y linfocitos, aunado también a un incremento en la concentración de citocinas hematopoyéticas que influyen en la mielopoyesis; tal es el caso del GM-CSF, M-CSF y G-CSF, tanto en el suero como en el exudado de la cavidad peritoneal en los ratones tratados (Metcalf, 1996; Lotem and Sachs, 1983). Existen también reportes de que la inoculación de CasNa aumenta el número de precursores mieloides en médula ósea, considerado como un indicativo de proliferación celular (Lieberman, 1989). Referente al efecto del CasNa en la linfopoyesis los antecedentes son escasos o nulos. Sin embargo, existen antecedentes con la proteína de la caseína donde se ha observado que un fragmento (β -caseína) es capaz de aumentar *in vitro* el número de linfocitos T y B (Wong, 1996), y por otro lado de manera controversial el grupo de Pessi, ha reportado que la caseína disminuye la proliferación de linfocitos T *in vitro* (Pessi, 2001), cabe recalcar que no existen reportes referentes al efecto del CasNa *in vivo* sobre la linfopoyesis así como la producción de citocinas clave para este evento. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha reportado que el CasNa acelera la transición de células granulocíticas en banda hacia células polimorfonucleares (Bautista, 1998), hemos demostrado también que el CasNa induce la producción de M-CSF *in vitro* y que las células responsables de tal efecto son los granulocitos (Santiago, 2010).

En este trabajo nos enfocamos principalmente a evaluar el efecto del CasNa sobre la mielopoyesis y linfopoyesis *in vivo* para aclarar así sus efectos en el sistema hematopoyético, y en base a los resultados evaluar si éste pudiese tener a futuro alguna aplicación clínica.

Para tal caso, observamos que tras la inoculación de CasNa (IP), se incrementa el número de células mononucleadas tanto en médula ósea, bazo y timo, órganos que pueden sostener tanto la mielo como la linfopoyesis en ratón (Bertrand, 2006; Coombes 2005; Von Freeden-Jeffry 1995), se ha considerado que tan solo este evento es un indicativo de activación de la proliferación celular (Zaph, 2008; Dolbeare, 1983). Sin embargo, para poder confirmar dicho evento nosotros evaluamos la incorporación de BrdU en estas células, considerando que en la actualidad esta técnica es ampliamente utilizada para detectar eventos de proliferación (Zhang P,2008; Dolbeare F 1983). Nuestros resultados confirman que el incremento en el número de células mononucleadas tanto en bazo como en médula ósea fue debido a la proliferación de esta población celular, sin embargo, en timo observamos que no existe un incremento en la incorporación de BrdU, y que solo aumenta el número celular. Tomando este resultado en consideración nos enfocamos posteriormente en hacer el análisis del efecto del CasNa sobre la linfopoyesis y mielopoyesis tan solo en la médula ósea y bazo. Los datos hasta aquí observados en cuanto al comportamiento del CasNa en médula ósea y el incremento en el número de células mononucleadas parecen concordar con los resultados del grupo de Lord y Lieberman (Lord K, 1993; Lieberman, 1989), así como los de Metcalf y Lotem (Metcalf, 1996; Lotem and Sachs, 1983,1985). Por otro lado, nuestros datos obtenidos en bazo y timo referente a la proliferación de células mononucleadas, son los primeros en ser reportados ya que en la actualidad no existen reportes previos del efecto *in vivo* del CasNa en estos órganos. Los resultados obtenidos en este trabajo, nos hacen pensar que el linaje granulocítico, es el que se ve influenciado principalmente bajo nuestro esquema de tratamiento, ya que observamos un incremento en la proliferación de estos en médula ósea de manera contundente, además de inducir la proliferación también hay un incremento en el índice fagocítico indicando que estas células no pierden su funcionalidad e inclusive la aumentan. En cuanto al linaje monocítico, nosotros observamos que la inoculación intraperitoneal de CasNa en primer lugar no incrementa de manera considerable este linaje en médula ósea, pero si en cavidad peritoneal, coincidiendo esto con el grupo de Metcalf (Metcalf, 1986). Sin embargo,

también observamos que, los monocitos en cavidad peritoneal incrementan el porcentaje de incorporación de BrdU. Esta observación aunada con el antecedente del CasNa como agente proinflamatorio nos hace sugerir que los monocitos generados en la médula migran de manera progresiva al sitio de inflamación, siendo así que en nuestro modelo de tratamiento la granulopoyesis toma papel principal, dejando en segundo término la monopoyesis, eritropoyesis, megacariopoyesis y linfopoyesis de células B, dado que estas últimas tampoco se ven influenciadas por el tratamiento con CasNa ó al menos en los tiempos de evaluación que consideramos en este trabajo. La prevalencia de la granulopoyesis en médula ósea, bajo nuestro tratamiento, se fortalece debido a que no sólo encontramos un incremento en la concentración de G-CSF en suero, sino también en médula ósea, pues se sabe que esta citocina puede influenciar dicho linaje, ya sea en su proliferación o diferenciación (Santiago, 2010, Noursadeghi, 2002). Además, no descartamos que se induzcan citocinas que promuevan la movilización de los otros linajes como las observadas por el grupo de Ueda, tal como el TNF- α e IL-1 (Ueda, 2004,2005). Por otro lado, no sólo encontramos G-CSF, M-CSF y GM-CSF en suero, sino también TPO y EPO; citocinas que contribuyen en la mielopoyesis y específicamente en la generación de eritrocitos y plaquetas (Metcalf, 2008; Laoisa, 2006). Cabe recordar que en los tiempos evaluados no encontramos aumento considerable en la proliferación tanto de eritrocitos como megacariocitos, como ya previamente habíamos comentado y quizás debería considerarse para futuras investigaciones. Existe el antecedente de que ante un evento de inflamación, es la granulopoyesis la que se ve influenciada principalmente, y que al mismo tiempo se observa una disminución de los linfocitos B en médula ósea de ratón. En este punto y con base a los resultados obtenidos concordamos con el grupo de Ueda (Ueda, 2004, 2005), ya que si bien disminuyen los linfocitos B en médula ósea, éstos incrementan su número y porcentaje de incorporación de BrdU en bazo, lo cual nos hace sugerir que posiblemente ante la granulopoyesis generada en médula ósea, los linfocitos B también generados en médula ósea salen de este órgano en estadios tempranos y migran a otros órganos a proliferar y diferenciarse, como es el caso del bazo en

ratón, ya que su microambiente genera las condiciones adecuadas para sostener dicho evento de manera natural (Bertrand, 2006; Von Freeden-Jeffry 1995). Sin embargo, cabe mencionar que, al solo haber evaluado el antígeno B220 no podemos estar seguros de que el CasNa induce la proliferación en etapas tempranas de la linfopoyesis B, o si sólo activa la proliferación de células B maduras, por lo que se necesita profundizar en dicho evento mediante la evaluación de incorporación de BrdU y la identificación de antígenos más específicos que se presenten en estadios más tempranos dentro del linaje B; como por ejemplo el S7 (Hardy, 1991). Ahora bien, este punto no demerita el valor de este trabajo, ya que no existían reportes del efecto *in vivo* del CasNa en esta población. En cuanto a la proliferación del linaje de células T, en nuestro estudio observamos solo un incremento en el número de linfocitos T en el timo, aunque no encontramos incremento en la concentración de incorporación de BrdU en este órgano, al parecer estos datos concuerdan con lo reportado por el grupo de Pessi (Pessi, 2001). Con lo anterior reforzamos la idea de que, ante eventos de inflamación, es la mielopoyesis el principal evento que se ve influenciado por el tratamiento con CasNa, coincidiendo en parte con el grupo de Ueda, que observó que ante un evento inflamatorio es este linaje mieloide el que se genera principalmente (Ueda, 2004, 2005). Nuestros resultados sugieren que la linfopoyesis, por lo menos de células B, en un evento inflamatorio que se desarrolla primordialmente en bazo, tomando un papel más significativo de órgano hematopoyético secundario. Los resultados obtenidos en cuanto al efecto *in vivo* del CasNa sobre las interleucinas que participan en la linfopoyesis como la IL-2, IL-7 e IL-15, toman gran relevancia ya que somos los primeros en reportarlo puesto que no existían antecedentes sobre el tema. Sin embargo, creemos que los tiempos considerados para la evaluación de la linfopoyesis en futuras investigaciones deberían ser diferentes a los de este trabajo, esto para observar si efectivamente el CasNa influye sobre este linaje posterior a la inoculación, tomando en consideración el hallazgo del aumento en la concentración de las interleucinas las cuales son clave para la linfopoyesis.

En este trabajo también se demostró que el CasNa es capaz de activar células del sistema inmunológico innato como lo son granulocitos y monocitos, ya que aumenta su capacidad fagocítica *in vivo*. Estos resultados, al menos en cuanto al linaje granulocítico, parecen concordar con los observados por el grupo de Noursadeghi, ya que él reporta un incremento en la activación de granulocitos bajo el estímulo de la caseína en ratones tratados con dosis letales de bacterias (Noursadeghi M, 2002). Por otro lado, somos los primeros en reportar la activación de los monocitos al observar un incremento del índice fagocítico en estas células en médula ósea. Estos resultados son de suma importancia, ya que en la actualidad la activación de células del sistema inmunológico innato se ha vuelto una alternativa para poder combatir agentes patógenos que han creado resistencia a los antibióticos (Noursadeghi M, 2002), así como para la protección contra patógenos oportunistas intrahospitalarios que ponen en riesgo la vida de los pacientes (Alalwani , 2010; Zaph, 2010; Popa, 2005; Millon, 1994).

Finalmente, con base en nuestros resultados, podemos sugerir que tras la inoculación vía intraperitoneal de CasNa, se induce primero un evento de inflamación el cual induce un incremento en la concentración de citocinas clave para la mielopoyesis y linfopoyesis como el G-CSF, GM-CSF, M-CSF, TPO, EPO, IL-2, IL-7 e IL-15, y también induce la degradación del CasNa en la cavidad peritoneal mediante células fagocíticas que están involucradas en la liberación de citocinas (Santiago, 2010; Azzara CD, 1985; Verdi RJ 1991). Posteriormente, las citocinas generadas entran a su vez a torrente sanguíneo, llegando inclusive a órganos blanco como la médula ósea ó bazo desempeñando un papel principal sobre estos órganos y dando como resultado que sea la granulopoyesis la que tenga un papel principal en la médula ósea dejando en segundo término los demás linajes tanto mieloides como linfoides, y con respecto al bazo al parecer es la linfopoyesis B la que se ve influenciada principalmente (Figura 18). Bajo este tenor, se ha conseguido el principal objetivo de este trabajo, el cual consistía en dilucidar el papel del CasNa tanto en la mielopoyesis como en la linfopoyesis *in vivo*, aún más, se demostró que dentro de los linajes influenciados por el CasNa

como son el granulocítico y monocítico se incrementó el índice fagocítico, evento que como ya mencionamos pudiese tener relevancia clínica a futuro.

CONCLUSIÓN

El caseinato de sodio, una sal de la caseína la principal proteína de la leche cuando es inoculado vía intraperitoneal en ratones Balb/c, es capaz de inducir principalmente la proliferación del linaje granulocítico en médula ósea, incrementa también la proliferación del linaje monocito macrófago e induce la migración de este a cavidad peritoneal, no incrementa la proliferación del linaje megacariocítico y de células eritroides tempranas, por otro lado, la inoculación de CasNa disminuyó la proliferación de linfocitos B en la médula ósea pero promovió la proliferación de células B en el bazo. Observamos también que el CasNa *in vivo*, incrementa las concentraciones de citocinas claves para la proliferación de células mieloides y linfoides como el G-CSF, GM-CSF, M-CSF, TPO, EPO. IL-2, IL-7 e IL-15. Además el CasNa incrementa el índice fagocítico de granulocitos y monocitos principalmente. Finalmente con los resultados obtenidos en este trabajo, sentamos las bases del efecto del CasNa sobre células hematopoyéticas de origen mieloides y linfoides *in vivo* sin embargo, hacemos hincapié que es necesario amplificar el estudio del efecto del CasNa sobre células linfoides en estadios más tempranos para entender aun más el efecto de este sobre la linfopoyesis temprana *in vivo*.

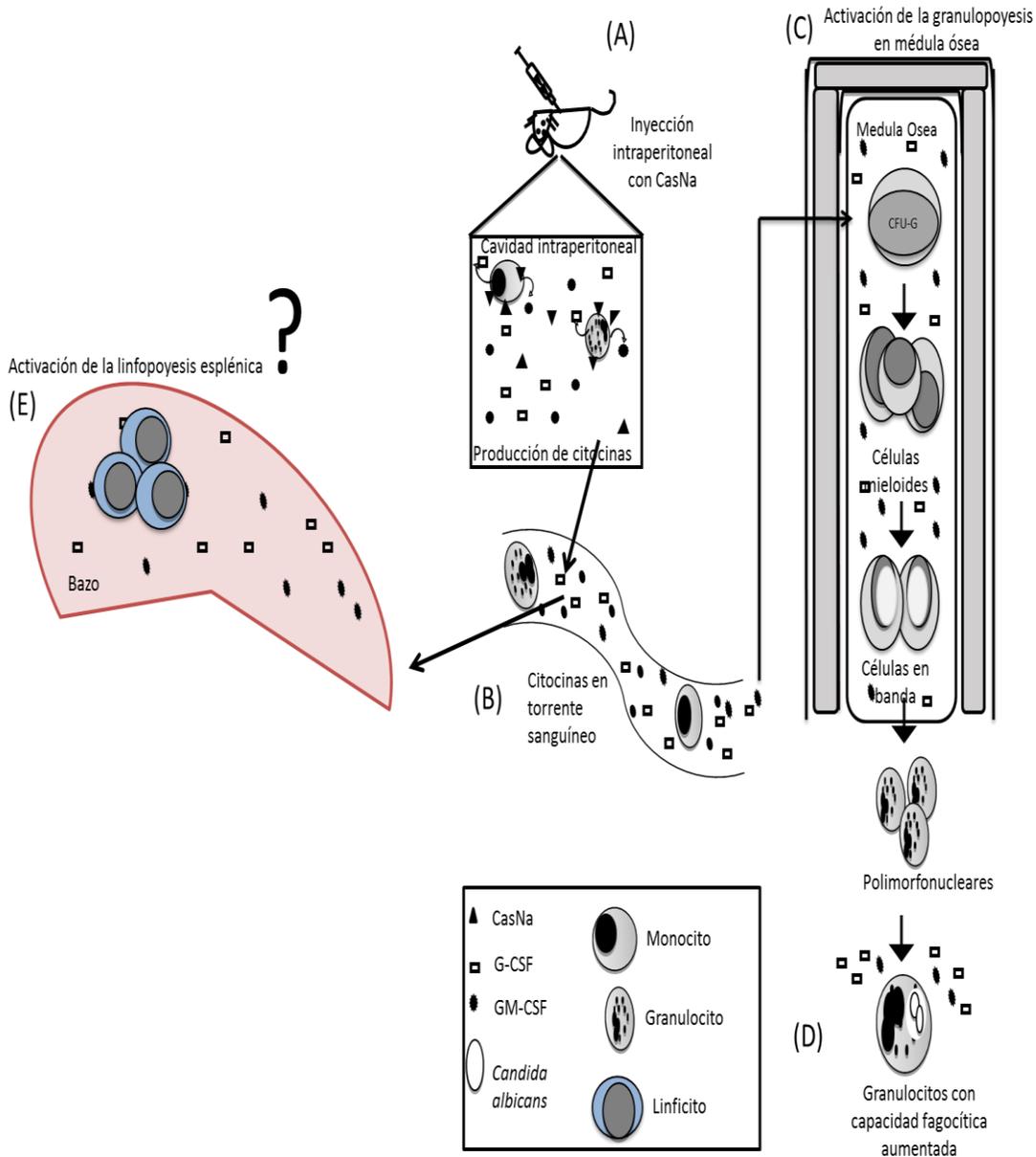


Figura 18.- Mecanismo de acción propuesto en la inducción de la granulopoyesis y la fagocitosis inducida por CasNa. (a) Después de la administración intraperitoneal de CasNa, granulocitos y macrófagos migran a la cavidad peritoneal del ratón. (b) Los granulocitos y macrófagos de cavidad peritoneal inducen la producción de citocinas tanto de la mielopoyesis como la linfopoyesis (G-CSF, GM-CSF, TPO, EPO, IL-2 e IL-7) y éstas entran al torrente sanguíneo y en médula ósea. (c) Tanto el G-CSF como el GM-CSF promueven la granulopoyesis médula ósea. (d) Ambas citocinas promueven la fagocitosis de granulocitos. (e) Existe la posibilidad de que el CasNa induzca la linfopoyesis esplénica mediante la inducción de citocinas tanto IL-2 como IL-7.

BIBLIOGRAFÍA

Abe N, Hozumi K, Hirano K, Yagita H, Habu S. Notch ligands transduce different magnitudes of signaling critical for determination of T-cell fate. *Eur. J. Immunol.* 2010; **40**:2608-2617.

Abbitt KB, Cotter MJ, Ridger VC, Crossman DC, Hellewell PG, Norman KE. Antibody ligation of murine Ly-6G induces neutropenia, blood flow cessation, and death via complement-dependent and independent mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 2009; **85**:55-63.

Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell.* 2005;**121**:295-306.

Alalwani SM, Sierigk J, Herr C, Pinkenburg O, Gallo R, Vogelmeier C, Bals R. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 2010; **40**:1118-26.

Alpdogan O, van den Brink MR. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. *Trends Immunol.* 2005. **26**:56-64

Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Suda T. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann. N .Y. Acad. Sci.* 2009; **1176**:36-46.

Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br. J. Haematol.* 2008; **141**:14-31.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000; **404**:193-197.

Azzara CD, Dimick PS. Lipoprotein lipase activity of milk from cows with prolonged subclinical mastitis. *J Dairy Sci*. 1985 ;68 **12**:3171-5

Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends. Immunol*. 2004; **25**:645-649.

Back J, Allman D, Chan S, Kastner P. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp. Hematol*. 2005; **33**:395-402.

Badillo AT, Flake AW. The regulatory role of stromal microenvironments in fetal hematopoietic ontogeny. *Stem. Cell. Rev*. 2006; **2**:241-246.

Baksheev VI, Kolomoets NM. [Erythropoietin in clinical practice]. *Klin. Med(Mosk)*. 2007; **85**:30-37.

Barry SC, Korpelainen E, Sun Q, Stomski FC, Moretti PA, Wakao H et al. Roles of the N and C terminal domains of the interleukin-3 receptor alpha chain in receptor function. *Blood*. 1997; **89**:842–852.

Bautista M. Efecto de factores activadores y diferenciadores sobre el granulocito-neutrófilo en banda: Diferenciación, fragmentación del ADN y producción de M-CSF. Tesis Licenciatura, 1998. FES Zaragoza, UNAM.

Bertrand Y.J, Desanti E. G, Lo-Man R, Leclerc C , Cumano A and Golub R. Fetal spleen stroma drives macrophage commitment. *Develop.* 2006; 133:3619-3628.

Bertrand, J. Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I. and Cumano A. Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102:134-139.

Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997; 94:5320-5325.

Baker, S.J., Rane, S.G., and Reddy, E.P. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene.* 2007; 26: 6724–673.

Blalock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Chang F, Hoyle PE, Wang XY, Algate PA et al. Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia.* 1999;13: 1109–1166.

Biermann H, Pietz B, Dreier R, Schmid KW, Sorg C, Sunderkötter C. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *J. Leukoc. Biol.* 1999; **65**:217-223.

Cantor A, Orkin S. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 2002; **21**:3368-3376.

Civin CI, Strauss LC, Fackler MJ, Trischmann TM, Wiley JM, Loken MR. Positive stem cell selection--basic science. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990; **333**:387-401.

Coombes, J. L., Robinson, N. J., Maloy, K. J., Uhlig, H. H. and Powrie, F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol. Rev.* 2005; **204**:184-194.

Coskun S, Hirschi KK. Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments. *Birth. Defects. Res. C. Embryo. Today.* 2010; **90**:229-42.

Cherdyntseva N, Shishkina A, Butorin I, Murase H, Gervas P, Kagiya TV. Effect of tocopherol-monoglucoside (TMG), a water-soluble glycosylated derivate of vitamin E, on hematopoietic recovery in irradiated mice. *J. Radiat. Res.* 2005; **46**:37-41.

Chen X, Welner RS, Kincade PW. A possible contribution of retinoids to regulation of fetal B lymphopoiesis. *Eur. J. Immunol.* 2009; **39**:2515-24.

Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001; **98**:14541-14546.

Cochrane SW, Zhao Y, Welner RS, Sun XH. Balance between Id and E proteins regulates myeloid-versus-lymphoid lineage decisions. *Blood.* 2009; **113**:1016-26.

Cyster, J. G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; **23**:127-159.

Darnell Jr JE. STATs and gene regulation. *Science.* 1997; **277**:1630–1635.

Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR.. Jak–STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; **264**:1415–1421.

Deford-Watts LM, Tassin TC, Becker AM, Medeiros JJ, Albanesi JP, Love PE, Wülfing C, van Oers NS. The cytoplasmic tail of the T cell receptor CD3 epsilon subunit contains a phospholipid-binding motif that regulates T cell functions. *J. Immunol.* 2009 ;**183**:1055-1064.

Diaconu CC, Neagu AI, Lungu R, Tardei G, Alexiu I, Bleotu C, Economescu MC, Bumbăcea RS, Pele I, Bumbăcea D. Plasticity of regulatory T cells under cytokine pressure. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 2010; **69**:190-196.

Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1983; **80**:5573-5577.

Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Sehgal PK, Nathan DG, Clark SC. Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature.* 1986; **321**.872-875.

Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, Hogg N. Integrins in immunity. *J. Cell. Sci.* 2009;**122**:215-25.

Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. 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.* 1993; **151**:2399-2408.

Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células Troncales Mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev. Inv. Clín.* 2006; **58**:498-511.

Fu, Y. X. and Chaplin, D. D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; **17**:399-433.

Gartsbein M, Alt A, Hashimoto K, Nakajima K, Kuroki T, Tennenbaum T. The role of protein kinase C delta activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation. *J. Cell. Sci.* 2006; **119**:470–481.

Glimm H, Eisterer W, Lee K, Cashman J, Holyoake TL, Nicolini F, Shultz LD, von Kalle C, Eaves CJ. Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta2 microglobulin-null mice. *J. Clin. Invest.* 2001; **107**:199-206

Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 1991; **173**:1213-25

Hao QL, Zhu J, Price MA, Payne KJ, Barsky LW, Crooks GM. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood.* 2001; **97**:3683-90.

Ilaria Bellantuono. Hematopoietic stem cells. *Int. J. of Biochem. and Cell Biol.* 2004; **36**:607-620.

Ihle JN, Nosaka T, Thierfelder W, Quelle FW, Shimoda K. Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells*. 1997; **15**:105–111.

Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; **13**:369–398.

Jacobsen FW, Veiby OP, Jacobsen SE. IL-7 stimulates CSF-induced proliferation of murine bone marrow macrophages and Mac-1+ myeloid progenitors in vitro. *J. Immunol.* 1994; **153**:270-276.

John F, McAdara J, Yaron Y, Sakaguchi M, John F, Gasson J. Characterization of HOX Gene Expresión During Myelopoiesis: Role of HOX A5 in Lineage Comminment and Maturation. *Blood* 1999; **93**:3391-3400.

Kina T, Ikuta K, Takayama E, Wada K, Majumdar AS, Weissman IL, Katsura Y. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycoporphin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br. J. Haematol.* 2000; **109**:280-287.

Kondo M, Scherer DC, King AG, Manz MG, Weissman IL. Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2001 ;**11**:520-6.
Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997; **91**:661-72.

Kikuchi K, Lai AY, Hsu CL, Kondo M. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J. Exp. Med.* 2005; **201**:1197-1203.

Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; **24**:705-738.

Lagunez S.H.E. Estimulación de la hematopoyesis medular y extramedular inducida por el caseinato de sodio (CasNa) en ratones BALB/c. Tesis de Licenciatura. 2004. FES-Zaragoza. UNAM.

Lévesque JP, Winkler IG. Hierarchy of immature hematopoietic cells related to blood flow and niche. *Curr. Opin. Hematol.* 2011; **18**:220-225.

Liebermann DA, Hoffman-Liebermann B. Proto-oncogene expression and dissection of the myeloid growth to differentiation developmental cascade. *Oncogene* 1989; **4**: 583-592.

Lotem J, Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation. *Int. J. Cancer* 1985; **35**:93-100.

Lotem, J, Sachs L. Control of in vivo differentiation of myeloid leukemic cells. III. Regulation by T lymphocytes and inflammation. *Int. J. Cancer* 1983; **32**:781-791.

Lord KA, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 1993; **13**:841-851.

Lin JX, Leonard WJ. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; **8**:313-332

Lowry J, Mackay J. GATA-1: one protein, many partners. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2006; **38**:6-11

Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; **24**:657-679

Maeda T, Merghoub T, Hobbs RM, Dong L, Maeda M, Zakrzewski J, van den Brink MR, Zelent A, Shigematsu H, Akashi K, Teruya-Feldstein J, Cattoretti G, Pandolfi PP. Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science.* 2007; **316**:860-6

Matsumura-Takeda K, Sogo S, Isakari Y, Harada Y, Nishioka K, Kawakami T, Ono T, Taki T. CD41+/CD45+ cells without acetylcholinesterase activity are immature and a major megakaryocytic population in murine bone marrow. *Stem Cells.* 2007; **25**:862-70.

Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002; **99**:11872-11877.

Martinez V. N. Estudio de la proliferación "in vivo" de células hematopoyéticas de médula ósea en ratones inyectados con caseinato de sodio (CasNa). Tesis de licenciatura. 2006. FES-Zaragoza. UNAM.

Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos J.J, Flores-Guzmán P y Chávez-González A. Hematopoyesis. *Cancerología.* 2007; **2**:95-107.

Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur. J. Haematol.* 1992.

Mebius, R. E. and Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; **5**:606-616.

Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood.* 2008; **111**:485-491.

Metcalf D, Greig KT, de Graaf CA, Loughran SJ, Alexander WS, Kauppi M, Hyland CD, Di Rago L, Mifsud S. Two distinct types of murine blast colony-forming cells are multipotential hematopoietic precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2008; **105**:18501-18506.

Metcalf D, Robb L., Dunn AR, Mifsud, S, Di Rago L. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood* 1996; **88**:3755-3764.

Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* 1994; **1**:661-73.

Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, Michel-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J. Clin. Microbiol.* 1994; **32**:1115-1118.

Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; **10**:295–331.

Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997; **124**:1929-1939.

Murata Y, Takaki S, Migita M, Kikuchi Y, Tominaga A, Takatsu K. Molecular cloning and expression of the human interleukin 5 receptor. *J. Exp. Med.* 1992; **175**:341–351.

Noursadeghi M, Bickerstaff MC, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys MB. Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J. Immunol.* 2002; **169**:913-919.

Oberlin E, El Hafny B, Petit-Cocault L, Souyri M. Definitive human and mouse hematopoiesis originates from the embryonic endothelium: a new class of HSCs based on VE-cadherin expression. *Int. J. Dev. Biol.* 2010; **54**:1165-73.

Okano M, Ohnota H, Sasaki R. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J. Nutr.* 1992; **122**:1376-83.

O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: NEw surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. 2002; **109**:S121–S131

Pelayo R, Welner R, Perry SS, Huang J, Baba Y, Yokota T, Kincade PW. Lymphoid progenitors and primary routes to becoming cells of the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 2005; **17**:100-107.

Perkins S, Feishman M. Hematopoietic Microenvironment. *J. Clin. Invest.* 1988; **81**:1072-1079.

Popa LG, Popa MI, Mihai IR. Case-control study to evaluate the link between immunosuppression and *Candida* spp. infection. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 2005; **64**:72-6.

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

Prieto-Echagüe V, Miller WT. Regulation of ack-family nonreceptor tyrosine kinases. *J. Signal. Transduct.* 2011; **2011**:742372

Ramakrishnan A, Torok-Storb BJ. The role of the marrow microenvironment in hematopoietic stem cell transplantation. *Cell. Ther. Transplant.* 2010; **2**:7-12.

Ramos-Mandujano G, Weiss-Steider B, Melo B, Córdova Y, Ledesma-Martínez E, Bustos S, Silvestre O, Aguiñiga I, Sosa N, Martínez I, Sánchez L, García A, Santiago-Osorio E. Alpha-, beta- and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D cl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiology.* 2008; **213**:133-141.

Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. Sodium caseinate induces expression and secretion of murine multipotent myeloid cell line 32D macrophage colony-stimulating factor. *Arch. Med. Res.* 2004; **35**:109-113.

Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene.* 2000; **19**:2532–2547.

Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene.* 2007; **26**:6715–6723.

Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp. Hematol.* 2005; **33**:131-43.

Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; **7**:105-17.

Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, Kawamura M, Bacon CM, Friedmann M et al. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science.* 1994; **266**:1042–1045.

Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, Riedy MC, Roberts JL, Aman MJ et al.. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science.* 1995; **270**:797–800.

Sadahira, Y., Yasuda, T., Yoshino, T., Manabe, T., Takeishi, T., Kobayashi, Y., Ebe, Y. and Naito, M. Impaired splenic erythropoiesis in phlebotomized mice injected with CL2MDP-liposome: an experimental model for studying the role of stromal macrophages in erythropoiesis. *J. Leukoc. Biol.* 2000; **68**:464-470.

Santiago-Osorio E, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Martínez I, Ramos-Mandujano G, Zambrano R, Monroy-García, A, Weiss-Steider B, Ledesma-Martínez E, Aguiñiga I. Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology.* 2010; **215**:332-339.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988; **241**:58-62.

Steevels TA, Meyaard L. Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. *Eur. J. Immunol.* 2011; **41**:575-87

Stanović S, Boranić M. Neuropeptides, endogenous opioid peptides and cell proliferation. *Lijec. Vjesn.* 1996; **121**:82-87.

Szilvassy S, Hoffman R. Enriched hemtopoietic stem cells: basic biology and clinical utility. *Biol. Blood. Marrow. Transpl.* 1995; **1**:1-17.

Taniguchi T. Cytokine signaling through non-receptor tyrosine kinases. *Science.* 1995; **268**:251–255.

Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A*. 2010; **77**:6-10.

Traver, D., Miyamoto, T., Christensen, J., Iwasaki-Arai, J., Akashi, K. and Weissman, I. L. Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. *Blood*. 2001; **98**:627-635

Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med*. 2004 **199**:47-58.

Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med*. 2005. **201**:1771-80.

Vanhaesebroeck B, Vogt PK, Rommel C. PI3K: from the bench to the clinic and back. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2010; **347**:1-19.

Verdi RJ, Barbano DM. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. *J Dairy Sci*. 1991; **74**:2077-81

Von Freeden-Jeffry, U., Vieira, P., Lucian, L. A., McNeil, T., Burdach, S. E. and Murray, R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med*. 1995; **181**:1519-1526.

Walstra P and Jenneis R. Dairy chemistry and physics. John Wiley Sons, New York. 1984

Welner RS, Pelayo R, Kincade PW. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol.* 2008; **8**:95-106.

Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune responses by bovine beta-casein. *Immunol. Cell. Biol.* 1996; **74**:323-9

Xiao BG, Lu CZ, Link H. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. *J. Cell. Mol. Med.* 2007; **11**:1272-1290.

Yan XL, Lan Y, Wang XY, He WY, Yao HY, Chen DB, Xiong JX, Gao J, Li Z, Yang G, Li XS, Liu YL, Zhang JY, Liu B, Mao N. Migration of dorsal aorta mesenchymal stem cells induced by mouse embryonic circulation. *Dev. Dyn.* 2011; **240**:65-74.

Yousefi B. The effects of all-trans retinoic acid on blood cells in rat's embryo. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2009; **22**:23-26.

Zaph C. Which species are in your feces? *J. Clin. Invest.* 2010; **120**:4182-4185.

Zhang P, Nelson S, Bagby GJ, Siggins R^{2nd}, Shellito JE, Welsh DA. The lineage-c-Kit+Sca-1+ cell response to *Escherichia coli* bacteremia in Balb/c mice. *Stem Cells.* 2008; **26**:1778-1786.

Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science.* 1999; **285**:1553-8

Zimmermann MB, Biebinger R, Rohner F, Dib A, Zeder C, Hurrell RF, Chaouki N. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; **84**:580-6.

Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis

V. Domínguez-Melendez · O. Silvestre-Santana · L. Moreno-Fierros · I. Aguiñiga-Sánchez · Ledesma Martínez · R. Marroquin-Segura · A. L. García-Hernández · B. Weiss-Steider · A. Marché-Cova · A. Monroy-García · L. Mora-García · Edelmiro Santiago-Osorio

Received: 31 May 2011 / Revised: 16 November 2011 / Accepted: 19 December 2011 / Published online: 20 January 2012
© Springer Basel AG 2012

Abstract

Objective and design Sodium caseinate (CasNa) induces differentiation and M-CSF production in mouse band granulocytes in vitro; however, it is not yet known if this molecule can also induce the proliferation and activation of the granulocyte lineage in vivo. In this work we evaluated the induction in vivo of granulopoiesis and the activation of granulocytes in mice treated with CasNa.

Material or subjects BALB/c male mice 8–12 weeks old were used.

Treatment The animals were inoculated intraperitoneally with 1 ml of CasNa (10% in PBS p/v) four times (every 48 h).

Methods Granulocyte proliferation was evaluated by flow cytometry; activation was evaluated by phagocytic indices. The cytokine was measured using an ELISA assay.

Results We show that CasNa increased bone marrow granulopoiesis percentage (38.35 ± 10.88 vs. 64.94 ± 34.14 BrdU+/Gr-1+ cells) and the granulocytes generated presented increased phagocytic indices (0.3 ± 0.1 vs. 0.6 ± 0.11 , $p < 0.05$). We also show that G-CSF (974 ± 411 vs. 3189 ± 350 pg/ml, $p < 0.05$) and GM-CSF increased in serum, but only G-CSF in bone marrow plasma.

Conclusions CasNa induces granulopoiesis with functional granulocytes, suggesting that this molecule could be an innate immune system activator.

Responsible Editor: Graham Wallace.

V. Domínguez-Melendez · O. Silvestre-Santana · I. Aguiñiga-Sánchez · L. Martínez · B. Weiss-Steider · E. Santiago-Osorio
Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, UNAM, Mexico, D.F., Mexico

R. Marroquin-Segura
Laboratorio de Inmunología, UNAM, Mexico, D.F., Mexico

A. Monroy-García · L. Mora-García
Laboratorio de Inmunobiología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Mexico, D.F., Mexico

A. L. García-Hernández
Laboratorio de Inmunidad En Mucosas, UBIMED, FES-Iztacala, UNAM, Mexico, D.F., Mexico

E. Santiago-Osorio (✉)
Laboratorio 8, PB, UMIEZ, Campus II, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM, Batalla 5 de Mayo S/N Esquina Fuerte Loreto, Colonia Ejército de Oriente, Iztapalapa, C.P. 09230 Mexico, D.F., Mexico
e-mail: edelmiro@servidor.unam.mx

Keywords Cytokine · Granulocytes · Phagocytosis · Sodium caseinate

L. Moreno-Fierros
Laboratorio de Inmunidad En Mucosas, UBIMED, FES-Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

A. Marché-Cova
Plantel San Lorenzo Tezonco, Cubículo D-221, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), Calle Prolongación San Isidro No. 151, Col. San Lorenzo Tezonco, Del. Iztapalapa, C.P. 09790 México, D.F., México

A. Marché-Cova
Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, Facultad de Ciencias, Universidad 3000 Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México, D.F., México

Introduction

Sodium caseinate (CasNa), a salt of casein, the main protein of milk, was used more than 20 years ago to produce an inflammatory response in the peritoneal cavity of mice [1, 2]. 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 [1, 2].

Likewise, several growth factors known to be involved in inflammatory processes including macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) [3], granulocyte-CSF (G-CSF) [4, 5] and granulocyte-macrophage-CSF (GM-CSF) [6, 7] are induced at high concentrations in the sera of mice treated with CasNa or casein [2, 8]. Moreover, our research group has recently shown that, after in-vitro stimulation with CasNa, granulocytes isolated from the bone marrow increased the production of M-CSF [9].

Although inoculation with CasNa or casein has remained a good inducer of G-CSF, a specific cytokine in the generation of granulocytic lineage cells [8, 10], it is not known whether it induces granulopoiesis. Taking into consideration the fact that band stage cells from bone marrow are differentiated into polymorphonuclear cells with CasNa [9], and myeloblasts and promyelocytic cells in mice bone marrow increase after intraperitoneal (i.p.) injection with CasNa [11], in this work we evaluated the possible induction of granulopoiesis in mice treated with CasNa. To this end, proliferation, differentiation and activation of the granulocytic lineage were evaluated by phagocytic indices in mononuclear cells, unless otherwise stated, from bone marrow of mice treated with CasNa.

Materials and methods

Mice

Eight- to 12-week-old BALB/c male mice were maintained in accordance with institutional guidelines under pathogen-free conditions and fed a standard laboratory diet. All experiments were carried out in strict accordance with the Mexican Law on Animal Treatment and Protection Guidelines. The Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, approved the experimental protocol.

Mice treated with CasNa

The mice were divided into two groups: control group vehicle treatment, or CasNa (obtained from Sigma Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO, USA), and each group contained five mice. The animals were inoculated i.p. four

times, with 1 ml of CasNa [10% in phosphate-buffered saline (PBS) w/v] every 48 h, and the control group was injected with PBS vehicle under the same conditions. Twenty-four hours after the last inoculation, the cells were obtained.

Bone marrow cells

To obtain total cells from bone marrow, IMDM (Gibco BRL, USA) was flushed through individual mouse femoral shafts using a syringe until the bone marrow tissue was obtained. The cells were pooled and washed three times by centrifugation in IMDM medium and then resuspended in 10 ml of IMDM containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL). The viability and total number of the total cells was determined on a hemocytometer by staining with Trypan blue. To obtain mononuclear cells, the total bone marrow cells were separated on Ficoll-Paque (Sigma) gradients at a density of 1.077, washed twice in PBS and suspended in IMDM containing 10% heat-inactivated FBS.

Cell morphology

Whole cell or mononuclear bone marrow cell smears were fixed immediately with methanol, stained with Wright's stain and dried, and differential morphology counts were performed manually under a microscope (BH-2, Olympus, Japan). Myeloblasts, promyelocytes, myelocytes, metamyelocytes, neutrophilic band stages and segmented neutrophils were classified using criteria established by Biermann [12].

Assay for cell proliferation

Mice were injected i.p. with bromodeoxyuridine (BrdU; 1 mg of BrdU/animal; BD Biosciences) and killed 24 h later. Mononuclear cells from bone marrow cells were obtained by Ficoll Histopaque (1.077 g/L, Sigma, México) and the concentration was adjusted to 2×10^6 cells/ml in staining buffer (PBS with 3% FBS). Cells were then stained for a surface marker with anti-Gr-1 antibody-phycoerythrin (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 1:100 diluted in staining buffer (PBS with bovine serum albumin 1%) and incubated for 30 min at 4°C to detect granulocyte lineage cells and then fixed, permeabilised, and stained with anti-BrdU antibody (1:50 diluted in perm-wash) using the FITC BrdU Flow Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. At the end of the staining procedure, cells were suspended in 0.3 ml of PBS containing 1% paraformaldehyde. Analysis of cell phenotypes and BrdU incorporation was performed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, San José, CA, USA) with BD Pro v.5.1.1 software (Becton-Dickinson)

according to standard procedures. For each sample, 50,000 cells were acquired for analysis.

Phagocytic indices

Candida albicans was maintained in Sabouroud broth and subcultured onto Sabouroud agar 72 h before use. The *C. albicans* was washed three times in PBS, adjusted to an optical density of 1.6 at 540 nm (3×10^8), and then opsonised with 2 ml of fresh human serum at 37°C for 20 min. After co-incubation of *C. albicans* with mice bone marrow leukocytes (4×10^6 /ml) at a ratio of 1:1 for 20 min at 37°C, cells were centrifuged, the supernatant discarded and the pellet suspended in a drop. Smears were stained with Wright's stain. The cells were visualised microscopically (Eclipse E400 Nikon, Japan). Phagocytic indices were determined by counting of two or more of ingested yeast cells in 300 consecutive band-polymorphonuclear cells.

Cytokine ELISA assay

To determine the concentration of bone marrow plasma (BMP) and serum cytokines, mice were killed 2 h after the last dose of CasNa and the amount of GM-CSF and G-CSF determined by ELISA. BMP was prepared by flushing both femurs and tibia with 500 μ L of cold PBS into Eppendorf-type centrifuge tubes. Cells/debris was removed by centrifugation at 3,000g for 10 min at 4°C; BMP and serum was stored at 20°C. The amount of GM-CSF and G-CSF was evaluated using an ELISA assay according to the manufacturer's instructions (Mouse GM-CSF and G-CSF Immunoassay, R&D Systems, MN, USA). The plates were read at 450 nm in a plate reader (Tecan Spectra, Austria)

Data analysis

Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. The statistical analysis was performed using an ANOVA Dunnett test ($p \leq 0.05$).

Results

CasNa increases the percentage of myeloid precursors in mouse bone marrow. It has been reported that three days after i.p. injection of 3 ml of CasNa (10% in PBS w/v), an increased percentage of myeloblasts in bone marrow can be observed [12]. Here, we show that injections of 0.1 g of CasNa in 1 ml (10% in PBS w/v) every 48 h for six days in BALB/c mice increases the total number of bone marrow leukocyte cells (in whole cell suspensions free of erythroid cells), without affecting cell viability (Table 1). We also found a significant increase in the percentage of myeloblasts, band cells, and segmented granulocytes, a decreased

Table 1 Number and viability of bone marrow cells from mice treated with or without CasNa

| Treatment | Bone marrow cell from femur | | |
|-----------|-----------------------------|-----------------|-------------------|
| | Number (1×10^6) | | MNC viability (%) |
| | Total | MNC | |
| Control | 16.3 \pm 2.8 | 3.3 \pm 0.79 | 93 \pm 1.2 |
| CasNa | 34.6 \pm 3.7* | 4.8 \pm 0.85* | 95 \pm 1.5 |

MNC mononuclear cell

* Results were significantly different ($p < 0.05$) from control as determined using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test ($n = 5$ per group)

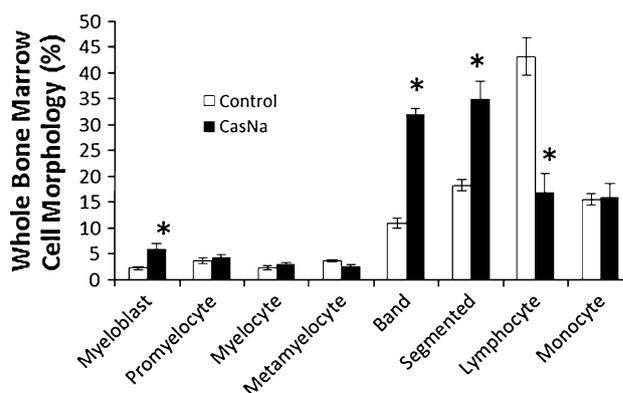


Fig. 1 Analysis of whole bone marrow cells from mice treated with CasNa. Morphology was analyzed in total bone marrow leukocytes (free of erythrocytes) obtained from BALB/c mice receiving four i.p. administrations of 1 ml PBS (control) or 0.1 g CasNa (one every 48 h) and were killed 24 h after the last administration, after Wright–Giemsa stained smear and count of 1,000 cells per mouse. Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) from that of control as determined using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test from five independent experiments using five mice per group and analyzing bone marrow cells from individual mice

lymphocyte population, but no changes in promyelocytes, myelocytes, metamyelocytes or monocytes (Fig. 1).

CasNa induces proliferation in bone marrow cells

To establish whether the increase in the number of mononuclear cells and myeloid precursors in the bone marrow of mice treated with CasNa is a result of increased proliferation induction, we measured incorporation of BrdU 24 h after BrdU administration in mice. We found a greater incorporation of BrdU in bone marrow mononuclear cells of mice treated with CasNa (Fig. 2a, b), indicating that the increased number of mononuclear cells is the result of cell proliferation.

CasNa induces granulocytic lineage cell proliferation

When we analyzed cells by flow cytometry, which separates cells based on granularity and size, we observed a higher cell

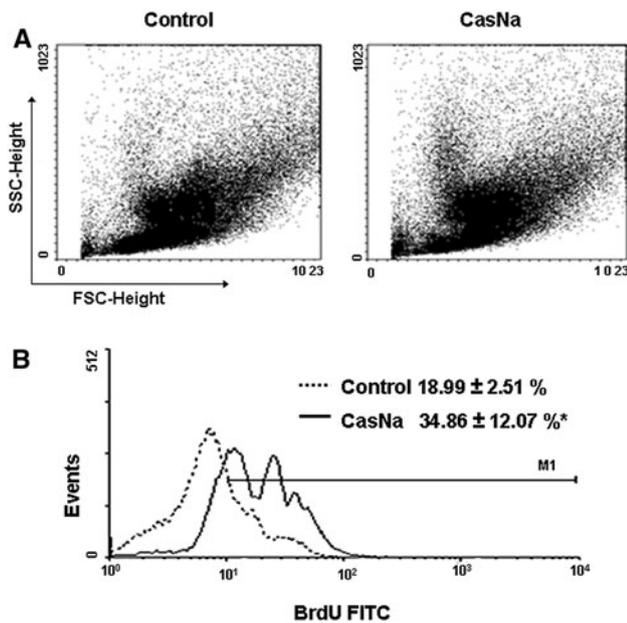


Fig. 2 Flow cytometry analysis of mononuclear bone marrow cells of mice treated i.p. every 48 h for 6 days with 1 ml PBS (control: *dashed line*) or 0.1 g CasNa in 1 ml PBS. Representative FACS plot from bone marrow mononuclear cells (a). Histogram of BrdU incorporation in mononuclear bone marrow cells (PBS: *dashed line*; CasNa: *solid line*) (b). Numbers represent the mean percentage of cells expressing BrdU \pm SD (from the marker to the right M1). Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) from control as determined using one-way ANOVA followed by Dunnett's pos-hoc test from five independent experiments using five mice per group and analyzing bone marrow cells from individual mice

density in the region of granulocytic lineage cells from mice treated with CasNa (Fig. 3a). Granulocytic lineage cells were identified as those positive for Gr-1, a specific antigen of the granulocytic lineage [13, 14], with a significant increase of $41.0 \pm 7\%$ versus $31.6 \pm 6\%$ in the control group ($p < 0.05$). Taking into consideration that incorporation of BrdU in the cell is widely used to detect events of cell proliferation in vitro and in vivo [15, 16], double staining with anti-BrdU and anti-Gr-1 antibodies revealed an increased percentage of BrdU/Gr-1-positive cells (Fig. 3b), which indicates that CasNa induces the proliferation of granulocytic lineage cells.

CasNa increased levels of G-CSF and GM-CSF in sera

It is known that G-CSF and GM-CSF are cytokines that induce granulopoiesis [17–19]. ELISA assay revealed that the levels of G-CSF and GM-CSF were increased in the serum of mice treated with CasNa, while in bone marrow plasma only G-CSF was increased (Table 2).

CasNa induces generation of active granulocytes

A current and widely used strategy to show the functionality of granulocytes is based on the phagocytic index (PI) [20,

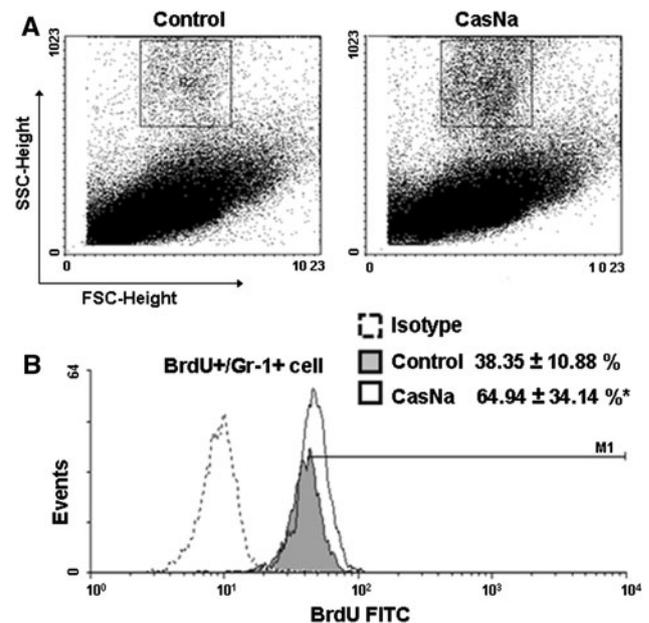


Fig. 3 Representative FACS plot from analysis of Gr-1-positive cells from the region corresponding to granulocytic cells (a). Double-positive population of BrdU/Gr-1 cells from Fig. 3a with isotype control (*dashed line*), control (PBS, *black/gray line*) and CasNa (*black/white line*) (b). Numbers represent the mean percentage of cells expressing BrdU/Gr-1 \pm SD (from the marker to the right M1), from five independent experiments using five mice per group and analyzing the cells of a given tissue from individual mice

Table 2 G-CSF and GM-CSF levels in serum and bone marrow plasma from mice treated with or without CasNa

| Treatment | Cytokine (pg/ml) | | | |
|-----------|------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | G-CSF | | GM-CSF | |
| | Serum | BMp | Serum | BMp |
| Control | 974 \pm 411 | 118 \pm 70 | ND | 0.86 \pm 0.02 |
| CasNa | 3189 \pm 350* | 1160 \pm 24* | 1.25 \pm 1.13 | 0.85 \pm 0.01 |

ND undetectable levels, BMp bone marrow plasma

* Results were significantly different ($p < 0.05$) from control as determined using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test ($n = 5$ per group)

21]. After showing that CasNa increases the proliferation of granulocytic lineage cells, we proceeded to assess their phagocytic capacity as an index of cell functionality. The data show that the granulocytes/neutrophils have a phagocytic capacity (Fig. 4a), but cells from mice treated with CasNa had higher PI than those from control mice (Fig. 4b).

Discussion

It has been shown that sodium caseinate, a salt of casein which is the main milk protein, inhibits in-vitro

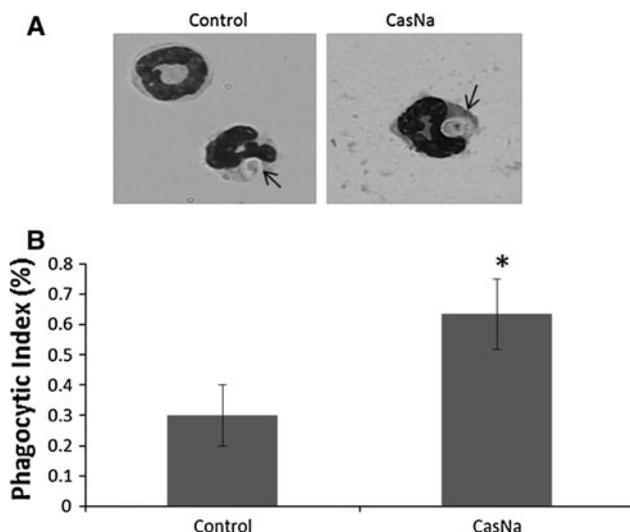


Fig. 4 Granulocyte phagocytic indices. (a) Yeast cells phagocytosed (arrow) by granulocytic cells from whole bone marrow cells from mice treated i.p. every 48 h for 6 days with 1 ml PBS (control) or 1 ml CasNa (10% in PBS). (b) Granulocyte phagocytic index: phagocytic indices were determined by counting of two or more ingested yeast cells in 300 consecutive band polymorphonuclear cells. Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) from control as determined using one-way ANOVA followed by Dunnett's pos-hoc test from five independent experiments using five mice per group and analyzing bone marrow cells from individual mice

proliferation of normal and leukemic myeloid cell lines [22, 23] and accelerates the transition of band cells from bone marrow to polymorphonuclear cells, thus including the induction of M-CSF [9]. CasNa is widely used in studies of in-vivo inflammatory responses. These studies have shown that CasNa causes migration of granulocytes to the site of injection as well as increased levels of G-CSF and GM-CSF in serum [1, 2, 8], both of which induce granulopoiesis [10, 17–19, 24]. After 3 days of i.p. administration of 3 ml of CasNa (10% in PBS w/v) in CD1 mice, there was an increasing percentage of myeloblasts in bone marrow cells [11, 25], suggesting that CasNa can modulate granulopoiesis.

This paper shows that the administration of 1 ml of CasNa (10% in PBS w/v) every 48 h for 6 days in BALB/c mice increases the percentage of myeloblasts and band cells (Fig. 1). Furthermore, the treatment increased the number of total and mononuclear cells from bone marrow cells (Table 1), events that are considered an index of activation of medullary hematopoiesis [26]. The increased BrdU incorporation by bone marrow mononuclear cells from mice treated with CasNa (Fig. 2) indicates that this molecule induces myeloid cell proliferation. Mononuclear cells were assessed by flow cytometry, and their granularity and size indicated that the granulocyte population was increased with CasNa (Fig. 3a). These data are in agreement with the increased Gr-1-positive population, an antigen expressed in

cells of the granulocytic lineage [14], Gr-1 is also expressed by proliferating precursor cells [16] and this was evident in the high percentage of double positive cells for BrdU and Gr-1 observed in mice treated with CasNa (Fig. 3b). These data suggest that CasNa induces proliferation of granulocytic lineage cells and this induction of granulopoiesis explains the increase in myeloid precursors observed by Lieberman's group in mice treated with CasNa [11].

It is well known that cytokines such as G-CSF and GM-CSF are inducers of granulopoiesis [18, 19, 27, 28] and both of these cytokines are induced by CasNa and casein [2, 9]. We found that CasNa increased the levels of both cytokines in serum and of G-CSF in bone marrow plasma (Table 2). Therefore, the induction of granulopoiesis induced by CasNa could be modulated by G-CSF and GM-CSF production.

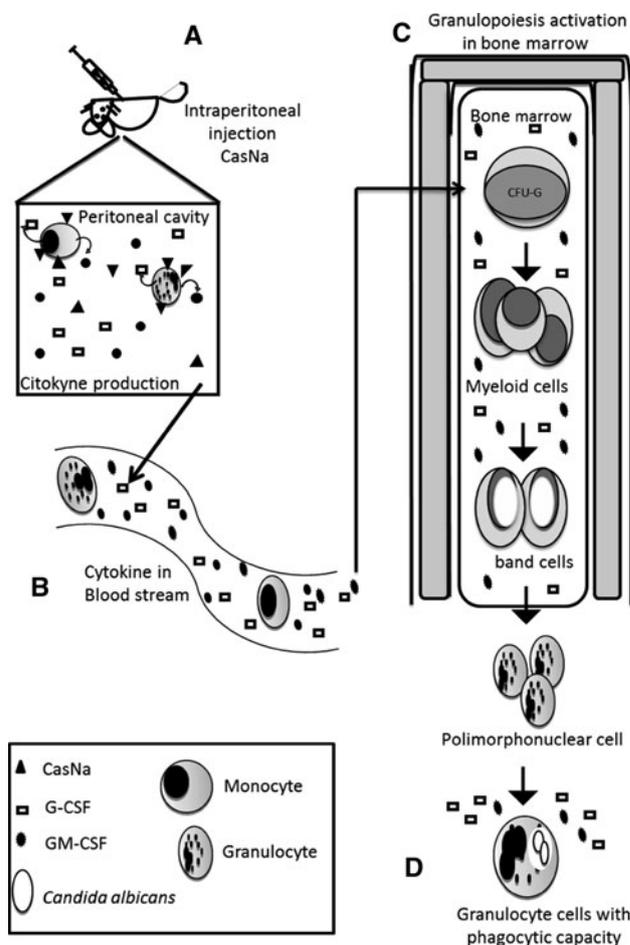


Fig. 5 Mechanism of action suggested in granulopoiesis and phagocytosis induced by CasNa. (a) After i.p. CasNa administration, granulocytes and macrophages migrate into the mouse peritoneal cavity. (b) Granulocytes and macrophages in the mouse peritoneal cavity are induced to produce G-CSF and GM-CSF and release them into the blood stream and bone marrow. (c) Both cytokines promote bone marrow granulopoiesis. (d) Both cytokines promote phagocytosis in granulocytes

On the other hand, we show that the granulocyte population increases due to the induction of granulopoiesis, whereas a reduction of lymphocytes in total white bone marrow cells was obtained from mice treated with CasNa (Table 1, Fig. 3). These data are consistent with increased granulopoiesis and reduction of lymphopoiesis in mice treated with inflammatory agents such as tumor necrosis factor- α and interleukin-1, because both of their progenitor cells share hematopoietic niches [29, 30]. It would be interesting to analyze in the future if lymphopoiesis is mobilized to a secondary hematopoietic tissue in mice treated with CasNa with the participation of pro-inflammatory cytokines.

Stimulation of granulopoiesis and phagocytosis plays a fundamental role in the innate immune response, and this confers protection against infectious agents [31, 33]. This study shows that, regardless of treatment, granulocytes phagocytose yeasts; however, the PI increases in mice treated with CasNa (Fig. 4b). These data indicate that CasNa mimics the biological activity of G-CSF administration which induces granulopoiesis and phagocytosis [31–34]. In this context, CasNa induces granulopoiesis and phagocytosis via induction and release of G-CSF and GM-CSF to the bloodstream, cytokines that are probably produced by granulocytes and macrophages (Fig. 5). Both of these cell types are found in the peritoneal cavity and are targets of CasNa [9].

On the other hand, the granulopoiesis induced by CasNa partly explains the survival of mice injected with lethal doses of bacteria after administration of casein, which may induce protection by granulocytes [31]. This reinforces the role of casein in activation of the innate immune system, a mechanism that is suggested to be useful in combating pathogens resistant to antibiotics [31]. In fact, it is well known that immunosuppressed patients present low levels of immunocompetent cells and are therefore susceptible to infections; for that reason an induction of active granulocytic cells could prove advantageous in these patients [35–37]. Taking into consideration that CasNa is a molecule that can induce granulopoiesis and strong phagocytosis, we consider that this molecule could have an interesting clinical application in these patients by increasing their innate immune capability to fight infections.

Induction of proliferation of normal myeloid cells mediated by CasNa may be of oncologic interest because it inhibits in-vitro proliferation of the mouse myelomonocytic leukemic cell line WEHI-3 [23]. It would be interesting to further study the cellular and molecular mechanism involved in the differential effects on leukemic and normal myeloid cells.

The biological activity induced by CasNa may be conferred by its structure because the inhibition of the proliferation of myeloid cell lines is lost if CasNa is treated

with trypsin [23]. In addition, the fact that CasNa induces the release of calcium within seconds [38] suggests the possible existence of a receptor, although we cannot rule out the possibility that such biological effects may also be caused by peptides released in the degradation of casein [39, 40]. Casein can be degraded by granulocyte and macrophage cells [41, 42], yielding bioactive peptide fragments that modulate the proliferation of some hematopoietic cell lines via opioid receptors [43–45]. These are interesting research questions that should be addressed in the future.

Conclusions

Sodium caseinate, a salt of casein, the main milk protein, is able to induce proliferation and activation of granulocytes as well as increase the serum concentration of two key cytokines, GM-CSF and G-CSF.

Acknowledgments We thank Mr. Ernesto Rivera Rosales for excellent technical assistance. This work was supported in part by PAPIIT (IN217407, IN225610) of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This paper constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). Domínguez-Melendez V, acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT), and UNAM.

References

1. Lotem J, Sachs L. Control of in vivo differentiation of myeloid leukemic cells. III. Regulation by T lymphocytes and inflammation. *Int J Cancer*. 1983;32:781–91.
2. Lotem J, Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer*. 1985;35:93–100.
3. Paniagua RT, Chang A, Mariano MM, Stein EA, Wang Q, Lindstrom TM, Sharpe O, Roscow C, Ho PP, Lee DM, Robinson WH. c-Fms-mediated differentiation and priming of monocyte lineage cells play a central role in autoimmune arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R32.
4. Steppich BA, Demetz G, Schulz S, von Wedel J, Pogatsa-Murray G, Braun SL, Stein A, Kastrati A, Schömig A, Ott I. Effects of G-CSF on systemic inflammation, coagulation and platelet activation in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res*. 2011;127:119–21.
5. Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood*. 2008;111(1):42–9.
6. Puljic R, Benediktus E, Plater-Zyberk C, Baeuerle PA, Szelenyi S, Brune K, Pahl A. Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. *Eur J Pharmacol*. 2007;557:230–5.
7. Cates EC, Gajewska BU, Goncharova S, Alvarez D, Fattouh R, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Jordana M. Effect of GM-CSF on

- immune, inflammatory and clinical responses to ragweed in a novel mouse model of mucosal sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:1076–86.
8. Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S, Di Rago L. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood.* 1996;88:3755–64.
 9. Santiago-Osorio E, Mora L, Bautista M, et al. Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology.* 2010;215:332–9.
 10. Hofer M, Vacek A, Weiterová L. Action of granulopoiesis-stimulating cytokines rhG-CSF, rhGM-CSF, and rmGM-CSF on murine haematopoietic progenitor cells for granulocytes and macrophages (GM-CFC). *Physiol Res.* 2005;54:207–13.
 11. Liebermann DA, Hoffman-Liebermann B. Proto-oncogene expression and dissection of the myeloid growth to differentiation developmental cascade. *Oncogene.* 1989;4:583–92.
 12. Biermann H, Pietz B, Dreier R, Schmid KW, Sorg C, Sunderkötter C. Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *J Leukoc Biol.* 1999;65:217–23.
 13. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. 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.* 1993;151:2399–408.
 14. Abbutt KB, Cotter MJ, Ridger VC, Crossman DC, Hellewell PG, Norman KE. Antibody ligation of murine Ly-6G induces neutropenia, blood flow cessation, and death via complement-dependent and independent mechanisms. *J Leukoc Biol.* 2009;85:55–63.
 15. Zhang P, Nelson S, Bagby GJ, Siggins R 2nd, Shellito JE, Welsh DA. The lineage-c-Kit+Sca-1+ cell response to *Escherichia coli* bacteremia in Balb/c mice. *Stem Cells.* 2008;26:1778–86.
 16. Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:5573–7.
 17. Liongue C, Wright C, Russell AP, Ward AC. Granulocyte colony-stimulating factor receptor: stimulating granulopoiesis and much more. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:2372–5.
 18. Kimura A, Rieger MA, Simone JM, et al. The transcription factors STAT5A/B regulate GM-CSF-mediated granulopoiesis. *Blood.* 2009;114:4721–8.
 19. Richards MK, Liu F, Iwasaki H, Akashi K, Link DC. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood.* 2003;102:3562–78.
 20. Shi Y, Kornovski BS, Savani R, Turley EA. A rapid, multiwell colorimetric assay for chemotaxis. *J Immunol Methods.* 1993;164:149–54.
 21. Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol.* 2005;56:397–415.
 22. Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. Sodium caseinate induces expression and secretion of murine multipotent myeloid cell line 32D macrophage colony-stimulating factor. *Arch Med Res.* 2004;35:109–13.
 23. Ramos-Mandujano G, Weiss-Steider B, Melo B, et al. Alpha-, beta- and kappa-caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32D c13 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Immunobiology.* 2008;213:133–41.
 24. Mora ML, Santiago E, Montesinos JJ, Weiss-Steider B. Hypothesis: the target cell of GM-CSF is a macrophage precursor capable to produce cells with the property to secrete a G-CSF like activity. *Eur Cytokine Netw.* 1992;3:337–41.
 25. Lord KA, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol Cell Biol.* 1993;13:841–51.
 26. Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Sehgal PK, Nathan DG, Clark SC. Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature.* 1986;321:872–5.
 27. Jiang D, Schwarz H. Regulation of granulocyte and macrophage populations of murine bone marrow cells by G-CSF and CD137 protein. *PLoS One.* 2010;5:e15565.
 28. Worm J, Stenvang J, Petri A, et al. Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:5784–92.
 29. Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med.* 2004;199:47–58.
 30. Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med.* 2005;201:1771–80.
 31. Noursadeghi M, Bickerstaff MC, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys MB. Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J Immunol.* 2002;169:913–9.
 32. Basu S, Hodgson G, Zhang HH, Katz M, Quilici C, Dunn AR. “Emergency” granulopoiesis in G-CSF-deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood.* 2000;95:3725–33.
 33. Kato T, Kitagawa S. Regulation of neutrophil functions by pro-inflammatory cytokines. *Int J Hematol.* 2006;84:205–9.
 34. Kamata N, Kutsuna H, Hato F, Kato T, Oshitani N, Arakawa T, Kitagawa S. Activation of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha: role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Int J Hematol.* 2004;80:421–7.
 35. Zaph C. Which species are in your feces? *J Clin Invest.* 2010;120:4182–5.
 36. Popa LG, Popa MI, Mihai IR. Case-control study to evaluate the link between immunosuppression and *Candida* spp infection. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2005;64:72–6.
 37. Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, Michel-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *J Clin Microbiol.* 1994;32:1115–8.
 38. Ferraretto A, Signorile A, Gravaghi C, Fiorilli A, Tettamanti G. Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal HT-29 tumor cells. *J Nutr.* 2001;131:1655–61.
 39. Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers.* 1997;43:119–28.
 40. Zucht HD, Raida M, Adermann K, Mägert HJ, Forssmann WG. Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.* 1995;372:185–8.
 41. Verdi RJ, Barbano DM. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. *J Dairy Sci.* 1991;74:2077–81.
 42. Schnyder J, Baggiolini M. Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and nonstimulated macrophages. *J Exp Med.* 1978;148:435–50.
 43. Meisel H, Bockelmann W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999;76:207–15.
 44. Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Castanas E. Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α s1-casein (α s1-casomorphin, and α s1-casomorphin amide). *Biochem.* 1996;319:903–8.
 45. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martin PM, Castanas E. Antiproliferative and receptor binding properties of alpha- and beta-casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol.* 1996;310:217–23.