



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

Efecto del Caseinato de Sodio (CasNa) en la
expresión de los genes del TNF-a y TGF-b en la línea celular mieloide 32D.

TESIS

Que para obtener el Título de:

BIOLOGO

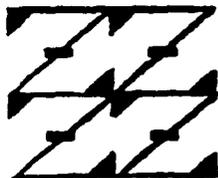
Presenta:

GONZÁLEZ RAMÍREZ JAVIER

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CÁNCER

México, D. F. 2002



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA REFLEXION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

**Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo económico de:
Beca para desarrollar tesis de licenciatura.
PROBETEL.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico en primera a mis padres inicio con mi madre Carmen Ramírez que siempre estaba conmigo en las buenas, en las malas, cuando no hacia las cosas correctamente, cuando las hacia bien, cuando llegaba mal pasado, cuando me despertaba a las 4:30 de la mañana para llegar a la escuela a las 6, etc; sin su apoyo no habría hecho nada.

A mi padre "Javier" González Meneses el cual a pesar de todos los problemas que le daba siempre me ayudaba en todo lo que podía y me enseñó que si algo me podría obsequiarme era el que yo pudiera estudiar, sin el no habría llegado hasta aquí.

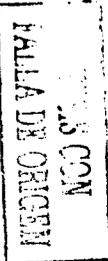
También quisiera dedicarle este trabajo a mis hermanos Carlos y Rosalía Irlanda que soportaron la mayoría de las veces mi mal genio, particularmente a Rosa que muchas veces me ayudo a centrar mis ideas y me ayudaba a hacer cosas de la escuela.

No podría dejar de dedicarle esto a mis tíos tanto maternos como paternos los cuales son un resto y no quisiera omitir a alguno por lo que solo agradezco el que me soportaran cuando iba a sus casas (particularmente a mi tía Sara y Lupe).

A mis primos que me pasaban juegos o revistas desde el Alejandro y el Edgar que me dejaban usar su computadora, el buen del Hugo que en realidad es mi tercer hermano, al Isaac y el Miguelon, que son con los que tengo más contacto y con los que me voy a los antros y convenciones.

A la palurda o pelusa que extraño mucho.

A los cuates en general desde el Mauricio pasando por el Felipe y su esposa que diga Alma Delia, la doctora Meme, Miriam, el buen Hugo Lors, el monster (Fer), a la jefa, el chayote, al Abundis, Ale, Bety chapis, al Erick, al Helicóptero Elizabeth, a Gaby (especialmente por soportar mi genio), Juan otaku, el buen Hugo come ratas, Lulú que nunca lleve al cine, a las muchachas: Bety, Luz apagón, Wendy y Rosy; a una nueva amiga Laura que sin ella no se habrían hecho algunas cosas de esta tesis, al buen del Gustavo marometas y Alma así como a su hermano y su novia que no me veían de manera mal aún cuando iba greñudo, barbudo con gorra



y walkman, a toda los cuates desde el Miguelon, Genaro, Oswald, Homero con los que echaba buen ... así como a todos los que veo y me saludan. Por último al buen del Juan M.P que compraba mis discos y me soportaba durante un buen rato así como los del invernadero que soportaban el que hablara muy fuerte.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

ATRA: Ácido retinoico

CasNa: Caseinato de Sodio.

CD27: Molécula expresada en la mayoría de los timocitos medulares y células T de sangre periférica y en una subpoblación de células B y NK.

CD30: El CD30 es una molécula originalmente definida por el anticuerpo Ki-1, el cual fue desarrollado contra la enfermedad de Hodgkin y células Reed-Sternberg. Después fue demostrado que las CD30 es también expresado en un linfoma de no-Hodgkin, así como en muchas líneas celulares humanas transformadas de células B y T

CD40: Glycoproteína expresada en las células B.

CFU-G: Unidad formadora de colonias de granulocitos

CFU-M: Unidad formadora de colonias de macrófagos

DNAc: DNA complementario

EPO: Eritropoyetina

Fas: Molécula expresada en células T activadas

FCH: Factor de crecimiento hematopoyético

G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos.

IFN: Interferón.

IL: Interleucina

LAP: Proteína asociada a la latencia.

LPS: Lipopolisacaridos

LT: Linfotoxina

MC: Medio Condicionado

MIP-1- α : Proteína inflamatoria de macrófagos-1-alfa

NO: Oxido nítrico

RT-PCR: Reacción de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa.

SFB: Suero fetal bovino

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : Factor de necrosis tumoral-alfa

TPO: Trombopoyetina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

Resumen	1
Marco Teórico	2
1. Hematopoyesis	2
1.1 Células hematopoyéticas progenitoras y multipotenciales.	3
1.2 Líneas mieloides multipotenciales.	5
1.3 Citocinas y hematopoyesis	5
2. TNF- α (Factor de necrosis tumoral-alfa)	6
2.1 Origen celular y producción	7
2.2 Actividades del TNF	7
2.2.1 Citotoxicidad	7
2.2.2 Diferenciación	8
2.2.3 Estimulación al crecimiento	8
2.2.4 Actividad Inmuno-modulatoria y Pro-inflamatoria	8
2.2.5 Otras actividades	8
2.3 TNF- α y hematopoyesis	8
3. TGF- β (Factor de crecimiento transformante-beta).	9
3.1 Latencia y activación	10
3.2 Regulación Multifuncional	10
3.3 Proliferación celular	10
3.4 TGF- β y la hematopoyesis	11
4. Derivados de la caseína	12
4.1 CasNa y Hematopoyesis	13
5. Planteamiento del problema	14
7. Hipótesis	15
8. Objetivos	16
9. Metodología	17
9.2 Líneas celulares	17
9.3 Tratamiento de las células 32-D con CasNa	17
9.5 Aislamiento de RNA total por medio de la técnica del Trizol (Gibco BRL)	17
9.6 Retrotranscripción.	18

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.7 Amplificación de los genes para el TNF- α , TGF- β mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	19
9.8 Análisis de los productos de PCR	20
9.9 Evaluación de la Bioactividad del TGF- β en las células Mv1Lu	21
9.10 Bioensayo de células L-929 para detectar la actividad biológica de TNF- α en el medio condicionado de 32-D	21
10. RESULTADOS	22
10.1 Las células 32-D estimuladas con CasNa producen un aumento de RNA mensajero para TNF- α .	22
10.2 Las células 32-D estimuladas con CasNa no producen un aumento de RNA mensajero para TGF- β .	74
10.3 El medio condicionado de las células 32-D presenta actividad tipo TNF- α pero no tiene actividad tipo TGF- β	26
11. Discusión	28
12. Conclusiones	31
13. Comentarios finales.	32
13. Apéndice	33
14. Bibliografía	34

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen.

La hematopoyesis es controlada por un grupo de citocinas conocidas como factores de crecimiento hematopoyético (FCH) e interleucinas, sin embargo, existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta que afectan la proliferación de las células hematopoyéticas. Algunos datos sugieren que la hematopoyesis es regulada por múltiples vías, algunas de ellas poco exploradas, pero que pueden tener gran impacto en la terapia de problemas hemato-oncológicos, como ha sido el caso del ácido retinoico en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda. Desde los años 60 surgen evidencias de la participación de la caseína en la hematopoyesis, ya que una dieta desprovista de caseína provocaba mielosupresión mientras que la caseína restablecía la hematopoyesis. En los últimos años se ha revelado que la dieta a partir de caseína induce la producción de eritropoyetina y con ello se activa la eritropoyesis. Recientemente se ha demostrado que el caseinato de sodio (CasNa) bloquea la proliferación a favor de la diferenciación de células hematopoyéticas multipotenciales 32D de ratón, esto lo coloca como un inhibidor de la hematopoyesis aunque se desconoce el mecanismo involucrado en esta inhibición. Al considerar que la regulación negativa de la hematopoyesis es responsabilidad de un grupo de citocinas, principalmente el factor de necrosis tumoral-alfa ($TNF-\alpha$), el factor de crecimiento transformante-beta ($TGF-\beta$), el interferón- gamma ($IFN-\gamma$) y la proteína inflamatoria de macrófagos ($MIP-1\alpha$), en este trabajo se tuvo como finalidad el demostrar si el CasNa era capaz de inducir la expresión de genes inhibidores de la hematopoyesis, concretamente el $TNF-\alpha$ y el $TGF-\beta$, así se demostró que las células 32-D producen de una manera constante los genes para dos inhibidores clásicos de la hematopoyesis, el $TGF-\beta$ y el $TNF-\alpha$. Adicionalmente, el tratamiento con CasNa a las células 32-D induce un aumento en la producción del RNAm para el $TNF-\alpha$ así como la liberación de $TNF-\alpha$ bioactivo. Estos datos puntualizan que el caseinato de sodio es capaz de inducir la expresión de citocinas inhibidoras de la hematopoyesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARCO TEÓRICO

Hematopoyesis.

Las células presentes en la circulación sanguínea desempeñan una gran variedad de funciones fundamentales para el organismo; los eritrocitos transportan el oxígeno; las plaquetas participan en el control de la coagulación sanguínea, mientras que los linfocitos, monocitos y granulocitos intervienen en la defensa inmunitaria contra cuerpos extraños como bacterias y virus (Zambrano-Ramírez *et al*, 1999).

Las células de la sangre tienen periodos de vida relativamente cortos, que varían de unas cuantas horas (granulocitos) a 12 ó 16 semanas (eritrocitos). De esta manera, diariamente son removidas de la circulación cantidades impresionantes de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Sin embargo, en una persona sana los niveles de células sanguíneas permanecen prácticamente constantes durante la etapa adulta, lo que quiere decir que para compensar la pérdida diaria de estas células, cada día el organismo produce cantidades igualmente extraordinarias de ellas. En efecto, en un adulto de 70 Kg., diariamente se producen 2×10^{11} eritrocitos, 2×10^{11} plaquetas y 7×10^{10} granulocitos (Mayani 1999).

El complejo proceso a través del cual se forman todas las células de la sangre es conocido como *hematopoyesis*. En el ser humano, la hematopoyesis comienza durante las primeras semanas del desarrollo prenatal, siendo el saco vitelino el primer órgano hematopoyético. A partir del tercer mes de desarrollo, la mayor parte de la actividad hematopoyética ocurre en el hígado fetal, el cual lleva a cabo esta función hasta el séptimo mes de la etapa prenatal. Durante este periodo, el bazo también actúa como órgano hematopoyético. Desde el sexto mes de desarrollo y durante toda la etapa postnatal hasta la muerte del individuo, la médula ósea es el principal órgano hematopoyético (Metcalf y Moore 1971).

En cada uno de los órganos hematopoyéticos las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente específico constituido por distintos tipos de células y proteínas extracelulares denominado microambiente hematopoyético. En la médula ósea, el microambiente hematopoyético está constituido por fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipocitos (todos ellos denominados células del estroma medular). Dichas células producen y secretan diversos tipos de proteínas, las cuales desempeñan un papel fundamental en la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Por una parte, las células del estroma medular secretan proteínas que

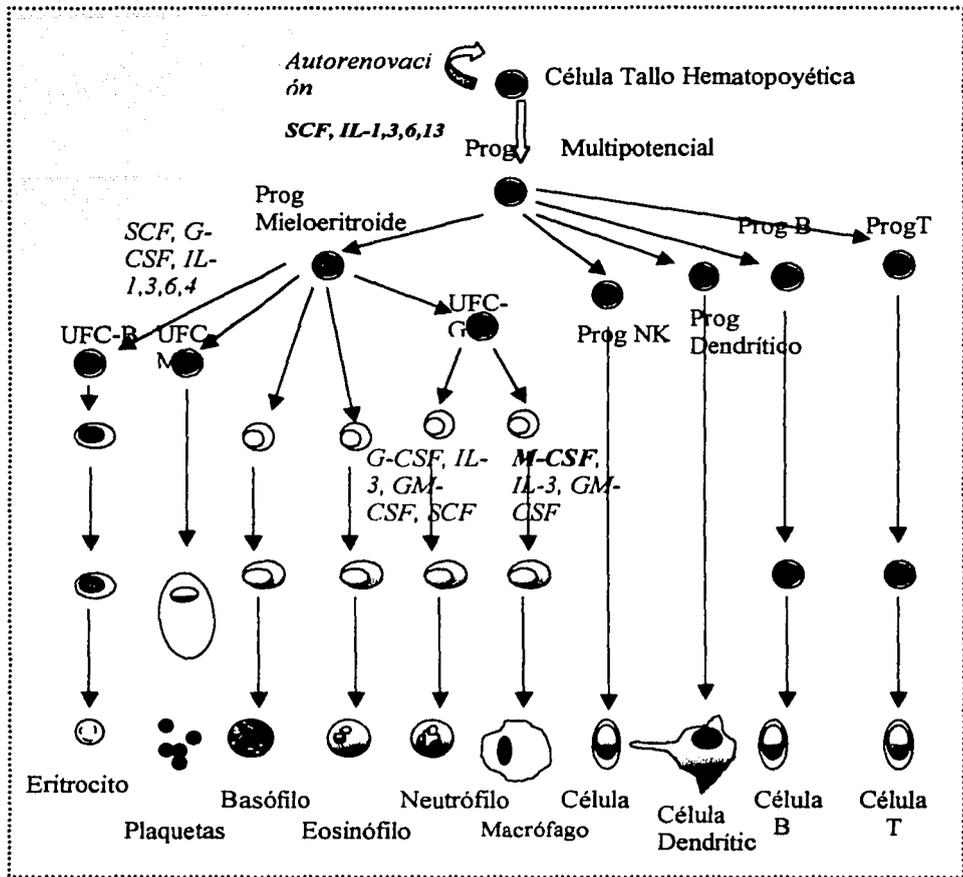
constituyen la matriz extracelular, como la colágena, la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos. Por otra parte estas células producen proteínas denominadas citocinas, las cuales regulan la fisiología de las células y sus precursores (Mayani 1999).

Células hematopoyéticas progenitoras y multipotenciales.

La existencia de las células progenitoras hematopoyéticas, fue evidenciada al descubrir que ratones irradiados letalmente sobrevivían después de la inyección de células de médula ósea de ratones singénicos sanos. Las células formaban focos de proliferación en el bazo de los ratones recuperados después de 8 días, cada foco fue resultado de la multiplicación de una sola célula progenitora, quién dio origen tanto al linaje mieloide como al linfoide. La proliferación de varias de ellas permitió la reconstitución del tejido hematopoyético de los ratones transplantados (Gordon y Barret 1985).

A estas células capaces de dar origen a un nódulo de proliferación a corto plazo, se les llamó unidades formadoras de colonias de bazo (UFC-B). Adicionalmente en cultivos *in vitro* de 7 días de células de médula ósea de ratón también se desarrollaron colonias mixtas de células hematopoyéticas, lo cual confirma la existencia de la UFC-B y refuerza la idea de que en la médula ósea existen células progenitoras con la capacidad de reconstituir la hematopoyesis en individuos inmunodeficientes a las cuales se les llamó células tallo hematopoyéticas (Metcalf y Moore, 1971).

Las células tallo hematopoyéticas dan origen a células precursoras comprometidas de linaje multi o monopotente y se les denomina como unidad formadora de colonias (CFU), la proliferación y diferenciación de estas células constituyen el compartimiento de las células maduras hematopoyéticas localizadas en la circulación sanguínea y otros tejidos (Figura 1).



Prog, Progenitora

UFC, Unidad Formadora de Colonias

SCF, Stem Cell Factor

M, Macrófagos

IL, Interleucina

CSF, Factor Estimulador de Colonias

G, Granulocitos

GM, Granulocito-macrófago

Figura 1. Modelo de la hematopoyesis mostrando las citocinas requeridas para la diferenciación de los diferentes tipos celulares hematopoyéticos (modificado de Morrinson et al, 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Líneas mieloides multipotenciales.

Los investigadores frecuentemente cultivan células en el laboratorio como una manera para estudiarlas, el cultivo celular ofrece muchas ventajas técnicas. La primera ventaja es que el medio de crecimiento es definido y puede ser controlado. Mínima cantidad de medio contiene lo suficiente para el crecimiento celular: sales, una fuente de carbono, una fuente de energía, vitaminas esenciales, aminoácidos, y elementos traza, particularmente el estudio de la hematopoyesis normal se ha facilitado gracias a la obtención de clones de líneas hematopoyéticas multipotentes "normales", cuyas células pueden cultivarse por tiempo indefinido pero retienen la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes celulares mieloides y linfoides, se caracterizan también por ser incapaces de reconstituir ratones letalmente irradiados o generar cualquier tipo de colonias de bazo *in vivo*, además de la incapacidad de proliferar *in vitro* en ausencia de algún factor de proliferación específico y la pérdida de tumorigenicidad *in vivo*. Algunos ejemplos de este tipo de células serían las líneas de ratón FDCP-2, B6SutA, B6JutA y 32D (Humpries *et al*, 1981; Greenberg *et al*, 1983, Yoshikawa *et al*, 1996).

La línea celular 32D, es dependiente de interleucina-3 (IL-3), fue establecida por cultivo a largo plazo de médula ósea de ratón C3He/J inyectado con el virus de leucemia Murina Friend, no libera virus infectivos y además no induce tumores cuando son transferidas a hospederos histocompatibles. Por lo tanto la línea 32D es considerada como una población de progenitores hematopoyéticos normales y ha sido usada para estudiar el proceso de control de la hematopoyesis normal (Greenberg *et al*, 1983).

Citocinas y hematopoyesis.

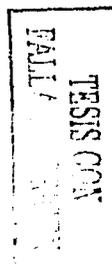
En general, en una célula eucarionte normal, el estricto control del ciclo celular se encuentra regulado por un amplio espectro de factores de crecimiento (Meager 1991). Tales factores son secretados por múltiples tipos celulares tanto normales como transformados (Lange *et al*, 1992, Margni 1996, Molema *et al*, 1999). Entre la mayoría de los moduladores de la proliferación celular destacan las citocinas. Estos moduladores ejercen su actividad de manera autócrina, parácrina o endócrina, intervienen en una fase determinada del ciclo celular, son capaces de regular la proliferación, la diferenciación y la activación de varios tipos celulares, comúnmente presentan actividad pleiotrópica

(diferentes citocinas son capaces de inducir el mismo efecto biológico) y sinérgica, circulan por los fluidos corporales, actúan a concentraciones muy bajas, tienen un tiempo de vida media muy corta y ejercen su efecto en determinadas células blanco al interactuar con receptores específicos de alta afinidad (Henrik y Bengt 1989; Meager 1991; Bendzten 1994; Santos-Argumedo 1994; Abbas 1996; Alberts 1996; Chávez 1997; Janeaway-Travers 1997).

Las células que se encuentran en el estroma medular producen estas glico-proteínas llamadas citocinas las cuales regulan la fisiología de las células sanguíneas y sus precursores. Particularmente la proliferación de las células precursoras hematopoyéticas está regulada por varias citocinas conocidas como factores de crecimiento hematopoyético e interleucinas (Metcalf 1998). Las células en su estado más primitivo requieren de la acción concertada del factor de células tallo, Interleucina-6 (IL-6), IL-3, IL-1, IL-11, eritropoyetina (EPO), ligando flt 3/flk2 (FL) y trombopoyetina (TPO) para su **sobrevivencia y proliferación**. Para las células progenitoras, la presencia de otros factores como la IL-3 o TPO, es suficiente para su **proliferación y diferenciación** hacia células maduras (Ogawa *et al* 1999). Por otro lado, la **regulación negativa** de la hematopoyesis está bajo el control de factores como el de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interferón gama (IFN- γ), factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) y proteína inflamatoria de macrófagos-1-alfa (MIP-1 α) (Jacobsen *et al*, 1994). También se ha incluido al óxido nítrico (NO) dentro de este grupo (Maciejewsky *et al*, 1995).

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α).

A principios de siglo se descubrió que ciertos agentes infecciosos y sus productos presentaban efectos anticancerosos en animales; en particular se demostró que la inyección de pequeñas cantidades de bacterias Gram negativas, vivas o muertas, podía provocar la necrosis hemorrágica de tumores de ratones. Posteriormente en 1970 se identificó y se purificó el componente activo de las bacterias Gram negativas y se estableció que se trataba de un complejo de lípidos y azúcares: los lipopolisacáridos (LPS) constituyentes de la pared celular, las cuales estimulaban la liberación de un factor antitumoral causante de la destrucción del cáncer. Ante el efecto de dicho factor sobre los tumores se le llamó **factor de necrosis tumoral** (Carswell *et al* 1975, Lloyd 1988).



Origen celular y producción

El TNF esta constituido por dos especies moleculares el TNF- α y el TNF- β sólo que el TNF- α es producido por macrófagos activados y el TNF- β por linfocitos activados (Abbas *et al*, 1996). Se creía originalmente que el TNF era estrictamente producido por monocitos y macrófagos. Hoy en día, al menos *in vitro*, muchos tipos celulares pueden producir TNF después de un estímulo apropiado: macrófagos, células NK, linfocitos T, células mast, fibroblastos, astrocitos, células Kupffer (Aggrawal *et al*, 1992). El TNF es expresado como una proteína precursora transmembranal de 26 kDa de la cual una proteína de 17 kDa madura es liberada al medio por rompimiento proteolítico (Beyaert y Fiers 1998).

Actividades del TNF.

1. Citotoxicidad.

Aunque la citotoxicidad puede no ser la mayor actividad del TNF *in vivo*, fue la primera atribuida a la proteína y puede ser considerada como su marca registrada de esta citocina. Aunque estudios primarios sugerían que el TNF era selectivamente citostático o citotóxico en líneas celulares transformadas y no tenía efecto en líneas celulares normales en cultivo, estudios subsecuentes mostraron que existen excepciones, tales como las células endoteliales, células del músculo liso, adipositos, fibroblastos y queratinocitos, los cuales bajo ciertas condiciones son inhibidos por el TNF. La acción citotóxica del TNF puede variar dependiendo de las condiciones de crecimiento y la diferenciación celular. No todas las líneas celulares son sensibles al efecto antiproliferativo del TNF, lo cual no es debido a alguna diferencia respecto a el número de receptores, tampoco hay una correlación entre la susceptibilidad al TNF y el origen histológico o embriológico de los tipos celulares tumorales. Muchos factores y condiciones que han sido identificados incrementan la sensibilidad de la célula a el TNF y aún en células resistentes al TNF, estos se vuelven sensibles en presencia del interferón, las altas temperaturas, inhibidores de la mitosis y algunos inhibidores de proteínas cinasas. Dependiendo del tipo de célula blanco y la presencia de inhibidores metabólicos, el TNF puede inducir muerte celular necrótica o apoptótica. En células murinas de ratón el TNF- α y el TNF- β , también conocida como linfotóxina (LT), tienen la misma capacidad de inducir respuesta citotóxica, mientras que con muchas células tumorales el LT es menos potente que el TNF. La razón de esta

diferencia no es clara y no puede ser explicada por una diferencia en la afinidad por el LT. (Beyaert y Fiers 1998).

2. Diferenciación.

El proceso de diferenciación puede ser afectado por muchas citocinas incluyendo los dos tipos de TNF. Por ejemplo, el TNF ha demostrado revertir la diferenciación de los adipocitos, disminuyendo la expresión de genes asociados con la lipogénesis para producir más preadipocitos sin diferenciar. En células HL-60, el TNF induce diferenciación monocítica, el LT también induce diferenciación de HL-60 dentro del linaje monocítico. El IFN- α e IFN- γ , el ácido retinoico y la 1- α -2,5 dihidroxivitamina D₃ han sido reportados que sinergizan con el TNF en la inducción de la diferenciación. Esta diferenciación puede estar también asociada en la actividad antitumoral del TNF (Beyaert y Fiers 1998).

3. Estimulación al crecimiento.

Además de ser citotóxico en muchos tipos celulares, el TNF ha demostrado ser mitogénico para un gran número de células normales, como fibroblastos, células del músculo liso, células T y células B. Algunas células tumorales como osteosarcoma y tumores de ovario son estimuladas a crecer por el TNF (Beyaert y Fiers 1998).

4. Actividad Inmuno-modulatoria y Pro-inflamatoria. En la actualidad se sabe que el TNF- α es la principal citocina elaborada en respuesta contra infecciones bacterianas y por agentes Gram negativos (Kovacs *et al*, 1998; Margni *et al*, 1996).

5. Otras actividades.

El TNF ha demostrado estimular la producción de varias hormonas, incluyendo la ACTH, la hormona de crecimiento, y la hormona estimuladora de la tiroides (Beyaert y Fiers 1998)

TNF- α y la hematopoyesis.

En la hematopoyesis, el TNF- α ha demostrado actuar tanto como un regulador positivo como uno negativo de la proliferación y diferenciación de células mieloides, algunos resultados sugieren que los efectos inhibitorios del TNF- α en células progenitoras de médula ósea son mediados a través de los dos receptores tanto el p55 como el p75 mientras que el receptor p55 exclusivamente esta involucrado en los efectos bidireccionales (Rusten *et al*, 1994). Aunque el TNF- α puede directamente y sinérgicamente aumentar el crecimiento de progenitores celulares en respuesta a IL-3 o GM-CSF (Jacobsen *et al*, 1996), el TNF- α , a diferencia de la LT, es uno de los más potentes inhibidores de la

hematopoyesis (Ware *et al*, 1992; Hsu *et al*, 1999), de hecho se considera al TNF- α como un regulador multifuncional de la hematopoyesis que potente y directamente inhibe el crecimiento *in vitro* de progenitores celulares de médula ósea humana y de ratón.

Factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β).

El TGF- β fue descubierto por De Larco y Torado en 1978. Originalmente se le llamó "sarcoma growth factors" o en español "factores de crecimiento de sarcoma", la actividad del TGF- β fue originalmente descubierta en el medio condicionado de células de ratón transformadas con el virus del sarcoma murino de Moloney en donde se encontró que el medio condicionado podía inducir adhesión al sustrato de tales células independientemente de su crecimiento (De Larco y Torado 1978), el cambio de nombre se debió a que estas moléculas tenían la habilidad de otorgarles a fibroblastos indicadores no transformados, propiedades funcionales asociadas con la transformación neoplásica (Fortunel *et al*, 2000).

El TGF- β , es actualmente identificado como TGF- β 1 no obstante hay isoformas todas ellas relacionadas, denominadas β 2, β 3, β 4, β 5 las cuales tienen un 70-80% de homología estructural entre ellas (Kloen *et al*, 1997). La proteína activa del TGF- β , es un dímero constituido por dos cadenas de 112 residuos de aminoácidos unidas a través de un puente disulfuro; constituyendo así, una masa molecular aparente de 25 kDa (Meager 1991; Karp 1996).

El TGF- β es una citocina multifuncional pleiotrópica caracterizada por su actividad anti-inflamatoria e inmunoreguladora (Richards *et al*, 1998; Kim *et al*, 1999). Se encuentra en una amplia variedad de tejidos fetales y adultos, así como en el suero; las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 sólo se encuentran en los mamíferos (Kloen *et al*, 1997; Durum y Muegge 1998). Las fuentes celulares del TGF- β son: los linfocitos TH2 y TH3, los osteoblastos, las células endoteliales, los fibroblastos, los queratinocitos, las plaquetas, las células de Sertoli, los macrófagos, las células leucémicas; en tejidos se encuentra en el pulmón, el riñón, la placenta, cordón umbilical y se halla en altas concentraciones en el hueso y el bazo. (Meager 1991; Bharat y Jordan 1992; Ruscetti *et al*, 1998).

Latencia y activación.

El TGF- β es predominantemente secretado por las células como un complejo latente que es incapaz de unirse a su receptor. El complejo latente consiste de un dímero maduro más dos pro-regiones de péptidos (llamados péptidos asociados a la latencia LAP) unidos no-covalentemente uno a otro (Ruscetti *et al*, 1998).

La activación extracelular de los complejos de TGF- β latentes es un proceso crítico en la regulación de las funciones del TGF- β *in vivo*. La interacción entre el TGF- β y el LAP es no-covalente y puede ser rota *in vitro* por tratamiento de calor o acidificación. Aunque variables fisicoquímicas tales como la acidificación local o la exposición a especies de oxígeno activo, pueden participar en la regulación de la activación del TGF- β , mecanismos que involucran el rompimiento proteolítico o modificación de los LAP son más probables que operen *in vivo*. Diferentes mecanismos de activación son presentados. La plasmina ha mostrado promover la activación de latente TGF- β por medio de rompimiento proteolítico dentro de la región amino-terminal LAP (la plasmina es una serina-proteasa). Este rompimiento no-covalente da como resultado la salida del TGF- β activo. En monocitos, macrófagos y células endoteliales la activación celular de el TGF- β latente se da mediante la participación del receptor manosa-6-fosfato/factor de crecimiento de insulina tipo II y el activador plasminógeno receptor para la urokinasa (UPA-R) (Fortunel *et al*, 2000).

Regulación Multifuncional del TGF- β .

La extraordinaria capacidad del TGF- β de afectar diversas funciones en las células de virtualmente cada linaje no tiene paralelo. Estas respuestas celulares mediadas por el TGF- β caen dentro de estas categorías: respuesta proliferativa, efectos en la diferenciación celular, y respuesta que involucra a la matriz extracelular. El TGF- β puede también regular la apoptosis. Además los efectos del TGF- β en varios tipos celulares han sido objeto de varias revisiones (Ruscetti *et al*, 1998).

Proliferación celular.

El efecto del TGF- β en el crecimiento celular es inhibitorio, en la mayoría de los tipos celulares, particularmente en el epitelial, endotelial, linfoide y hematopoyético, Casos en

los que este factor actué como un promotor del crecimiento son escasos, y en la mayoría de ellos el efecto del TGF- β puede ser indirecto, al estimular la producción de mitógenos o sus receptores. Es su efecto inhibitorio el que ha atraído a muchos investigadores debido a que sus efectos como la morfogénesis, inmunosupresión, y supresión de tumores, son un resultado de su función antitumoral. Los mecanismos por los cuales el TGF- β regula la inhibición del crecimiento no son completamente conocidos pero involucran la regulación del ciclo celular (Ruscetti *et al*, 1998).

Por otro lado se ha demostrado que progenitores primarios producen TGF- β 1 y son inhibidos de una manera parácrina o autócrina (Batard *et al*, 2000).

TGF- β y la hematopoyesis.

Los progenitores celulares hematopoyéticos humanos y murinos se encuentran quiescentes o en un estado de ciclo celular lento en los adultos. Se ha propuesto al TGF- β como un buen candidato para el control de la quiescencia. Esta posible función del TGF- β ha sido estudiada extensivamente *in vitro* usando varios ensayos en cultivos de células humanas y murinas. Todos estos estudios *in vitro* sugieren que el TGF- β inhibe preferencialmente el ciclo celular de la mayoría de las células hematopoyéticas primitivas. Sin embargo estudios más específicos como los realizados en el desarrollo celular de granulocitos y monocito-macrófagos el TGF- β ha mostrado efectos bidireccionales. Se sabe que las células maduras de Granulocitos y monocito/macrófagos se desarrollan de un progenitor mielóide común (CFU-GM). Algunos estudios han descrito efectos positivos y negativos por parte del TGF- β en la mielopoyesis *in vitro*. Efectos inhibitorios fueron principalmente observados en progenitores mieloides bipotentes tempranos, mientras que en células en fases posteriores se estimularon e inhibieron, dependiendo de los factores presentes. EL TGF- β añadido en un medio semisólido que contiene IL-3, IL-6, IL-11, Epo, GM-CSF y G-CSF ha sido encontrado que inhibe el crecimiento de HPP-GM, pero no de CFU-G y CFU-M. Al contrario, cuando los efectos regulatorios del TGF- β fueron estudiados en presencia de citocinas individuales, efectos claros de estimulación fueron observados en fases medias y posteriores del desarrollo celular. Por ejemplo, en medios de cultivo que contenían solo GM-CSF y TGF- β , estos factores sinergizaban y promovían el desarrollo de una

población de estadio medio CFU-GM (al día 7) mientras que fases más tempranas no fueron estimuladas. Los efectos del TGF- β 1 en el desarrollo de linajes celulares tanto G como M han sido analizados por separado. Se encontró que el TGF- β 1 sinergiza con el GM-CSF para estimular el crecimiento y diferenciación celular de progenitores granulocíticos de ratón. Tanto efectos negativos como positivos en la proliferación de células macrofágicas han sido descritos. Además, el TGF- β ha demostrado inhibir la proliferación de macrófagos de ratón dependientes de GM-CSF y M-CSF, mientras que la proliferación de células más avanzadas o maduras fue estimulada. Otro estudio desarrollado en células de ratón demostró un efecto positivo del TGF- β 1 en la proliferación inducida por el GM-CSF pero un efecto inhibitorio en la proliferación de macrófagos estimulados por M-CSF (Fortunel *et al*, 2000).

Derivados de la caseína.

La caseína es la principal proteína de la leche, se encuentra en forma de micelas compuestas por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas α -1, α -2, β y κ -caseínas, que junto con algunos derivados formados por proteólisis de estas cadenas son incluidas en la categoría de caseínas. La caseína insoluble en agua, puede ser diluida en un alcalí a pH 6.6 produciendo derivados solubles conocidos como caseinatos (Hall 1971).

El caseinato de sodio se obtiene disolviendo caseína en hidróxido de sodio y posteriormente sometido a evaporación, con lo cual se obtiene un polvo blanco sin sabor, ni olor, soluble en agua y contiene un 65% de proteínas. Debido a su excelente valor nutricional es ampliamente utilizado en la industria alimenticia (generalmente usado del 2 al 4% del total de sólido en el producto), como fuente de proteínas en cereales y otros productos secos, especialmente en alimentos para bebés, productos dietéticos y para diabéticos (Walstra 1984).

CasNa y Hematopoyesis.

Aunque no existen evidencias directas de la participación de la caseína en la hematopoyesis, desde la década de los años 60, surgen las primeras evidencias de la participación de la caseína en la hematopoyesis, particularmente porque una dieta

desprovista de caseína provocaba una mielosupresión, mientras que la adición de caseína restablecía la mielopoyesis en estos ratones (Aschkenasy 1971). En los últimos años se ha revelado que una dieta a partir de caseína induce la producción de eritropoyetina y con ello activa la eritropoyesis (Okano *et al*, 1992), otros datos indican que puede activar a los leucocitos ya que la caseína o su sal, el caseinato de sodio, inyectada vía intraperitoneal en ratones o peces, inducen una respuesta inflamatoria, promoviendo inicialmente la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal (Passsotti *et al*, 1993; Aranishi *et al*, 1997).

Adicionalmente, se ha reportado un incremento de la concentración de citocinas tipo factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y de granulocitos (G-CSF), tanto en el suero como en el fluido de la cavidad peritoneal de ratones inyectados con CasNa (Lotem *et al*, 1985). Por otro lado en este laboratorio se han proporcionado evidencias de que la inyección de CasNa a la cavidad peritoneal de ratón, favorece la acumulación de granulocito-neutrófilos y de macrófagos, aunque sólo induce la producción de M-CSF en los granulocitos, un factor que promueve la hematopoyesis (Santiago 1994). Este conjunto de datos sugiere que el CasNa tiene la capacidad para inducir la liberación de citocinas.

Por último datos presentados recientemente en este laboratorio dieron evidencia de que el caseinato de sodio (CasNa) también modula la hematopoyesis. La adición del CasNa al cultivo de células 32-D una línea dependiente de interleucina-3 (IL-3) y ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis "normal", redujo la multiplicación celular en forma dosis dependiente a pesar de la presencia de IL-3 (Ramos *et al*, 2000).

Planteamiento del problema y justificación.

En el tratamiento de las leucemias se emplean tanto la quimioterapia como la radiación ionizante, sin embargo estos tratamientos son demasiado agresivos en los pacientes, de ahí la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas. Dentro de estas alternativas se encuentran casos como el del ácido retinoico que favorece la diferenciación de células leucémicas promielocíticas, tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo ha mostrado limitaciones clínicas, concretamente los pacientes llegan a sufrir recaídas y presentan resistencia a posteriores tratamientos con ATRA (Breitman *et al*, 1994). Debido a esto sigue vigente la necesidad de encontrar nuevas alternativas de modulación de la hematopoyesis, lo cual permita establecer bases sólidas para mejorar las estrategias en la resolución de problemas hematológicos.

Desde los años 60 surgen evidencias de la participación de la caseína en la hematopoyesis, ya que una dieta desprovista de caseína provocaba mielosupresión mientras que la caseína restablecía la hematopoyesis ya en los últimos años se ha revelado que la dieta a partir de caseína induce la producción de eritropoyetina y con ello se activa la eritropoyesis. Recientemente se dieron evidencias de que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína, también modula la hematopoyesis, particularmente reduciendo la proliferación de las células 32D, una línea hematopoyética multipotencial de ratón y dependiente de IL-3 (Ramos *et al*, 2000). Considerando que entre los principales inhibidores de la hematopoyesis se encuentran el TNF- α , el TGF- β , el IFN-gamma (IFN- γ) y la proteína inflamatoria de macrófagos-alfa (MIP-1 α) en este trabajo se explora la posibilidad de que el caseinato de sodio pudiera tener la capacidad de inducir la expresión de genes inhibidores como el TNF- α y TGF- β en las células 32D. Estos datos permitirán plantear una hipótesis más general para explicar el mecanismo de inhibición de las células 32D tratadas con CasNa y así ampliar el conocimiento básico de la hematopoyesis.

Hipótesis

Se sabe que el caseinato de sodio (CasNa) es un inhibidor de la proliferación de las células 32-D, una línea mieloide dependiente de IL-3, considerando que la regulación negativa de la hematopoyesis está bajo el control de factores tales como el de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), es posible que este efecto inhibitorio sea consecuencia de la inducción a expresar factores inhibidores como el TGF- β y el TNF- α

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar si el caseinato de sodio (CasNa) induce la expresión de citocinas inhibitoras de la hematopoyesis como el TNF- α y el TGF- β

Objetivos Particulares

Establecer si el CasNa induce la expresión de RNAm para TNF- α y TGF- β en las células 32D por medio de la técnica de RT-PCR.

Evaluar si los medios condicionados de las células 32D tratadas con CasNa presentan actividad biológica sobre la línea celular Mv1Lu sensible al TGF- β y en la línea L-929 sensible al TNF- α .

Metodología.

Líneas celulares.

La línea hematopoyética multipotencial 32D dependiente de IL-3, fue cultivada en una atmósfera al 5% de CO₂ y 37°C en medio Iscove's Modified Dulbecco's (Gibco BRL, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente desactivado (Gibco BRL, USA) y 0.5 ng/mL de IL-3 (Gibco BRL, USA). El cultivo fue mantenido con una densidad inicial de 1X10⁵ células/mL y resemebrando a las 48 hrs en cajas Petri (Fisher Brand, Denmark).

Tratamiento de las células 32D con CasNa.

Las células 32D (1X10⁵ células/ml) fueron estimuladas con CasNa (20mM) por 36, 48 y 60 horas, dosis que induce la inhibición de las células 32D (Ramos et al, 2000). En los ensayos se incluyeron como controles, cultivos con 20 µl/ml de PBS.

Aislamiento de RNA total por medio de la técnica del Trizol (Gibco BRL, USA)

El RNA puede ser aislado de cultivos celulares órganos o muestras de órganos de especímenes vivos o muertos, los protocolos para el aislamiento de RNA comienzan con lisis celular que es mediada por una solución de Trizol de donde se obtuvo el RNA total a partir de las células 32D tratadas o no con CasNa. El RNAm obtenido sirvió como plantilla para la retrotranscripción (RT). La extracción se realizó como sigue:

1. Las células 32D con tratamiento y sin tratamiento se resuspendieron en 1 ml de TRIZOL (Gibco BRL, U.S.A.). Esta suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, para favorecer la disociación de los complejos de nucleoproteínas.
2. Enseguida se le adicionó 0.2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos para luego incubar por 3 minutos a temperatura ambiente.
3. La muestra se centrifugó a no más de 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
4. Posteriormente la fase acuosa (fase transparente) se transfirió a un tubo eppendorf nuevo que contenía 0.5 ml de isopropanol, la muestra se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a no más de 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

5. El botón fue lavado con 1 ml de etanol al 75%, preparado con agua en dietilpirocarbonato (apendice 1).
6. Por último se resuspendió en 15 μ l de agua con dietilpirocarbonato.
7. Se calentaron las muestras a 60°C por 5 minutos.

Para cuantificar la presencia de RNA en solución, se utilizó un espectrofotómetro (Perkin-Elmer, USA) a una longitud de onda de 260 y 280 nanómetros. Finalmente la calidad del RNA obtenido se visualizó en un gel de agarosa con formamida (Gibco BRL, USA) especial para RNA.

Retrotranscripción.

De acuerdo a la concentración de RNA obtenida se determinó el volumen de la solución de RNA necesario para tomar 1.0 μ g para la retrotranscripción, para lo cual se preparó la siguiente mezcla de reacción como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 1) considerando que el volumen final en un tubo de reacción debe ser de 10 μ l:

	1 Rx
MgCl ₂	2 μ l
Amortiguador de retrotranscripción 5X	1 μ l
Agua DEPC	*
5mM dNTP's	4 μ l
Inhibidor de RNAsa	0.5 μ l
Enzima M-MLV RT	0.5 μ l

Tabla 1. Preparación de la mezcla de retrotranscripción

*** El volumen de agua DEPC dependía de el volumen de RNA en solución a utilizar.**

Al tener preparada la mezcla se depositó lo siguiente en el tubo de reacción:

1. 0.5 μ l de Oligo dT.
2. RNA (el volumen dependía de la concentración obtenida).
3. 0.5 μ l de DTT

Al terminar de agregar esto se colocaron las muestras en el termociclador en el que se corrió el siguiente programa:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. La mezcla se colocó a 42° C por una hora
2. La temperatura se subió a 90° C por diez minutos
3. Finalmente se llevó a 4° C por una hora.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Cyclogene Techne, USA).

Amplificación de los genes para el TNF- α , TGF- β mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la amplificación de los genes para el TNF- α y el TGF- β se preparó una mezcla de reacción la cual se muestra en la siguiente tabla considerando que el volumen final en un tubo de reacción debe de ser de 20 μ l. **Todos los reactivos y la mezcla de reacción deben mantenerse en hielo.**

Reactivo	[]/Rx	μ l/Rx
Amortiguador de PCR	1X	2.0 μ l
dNTP's	0,2 mM	0.8 μ l
Oligo β -actina	0.1 μ M	0.1 μ l
***Oligos	0.1 μ M	0.1 μ l
Taq DNA pol	0.5 U	0.1 μ l
Agua para PCR		11.9 μ l
Volumen final		15 μ l

Tabla 2. Características y preparación de la mezcla para PCR en un tubo de reacción

*****De acuerdo al gen amplificado se colocó el oligonucleotido correspondiente (Ver tabla 3)**

Al tener preparada la mezcla se depositaron 5 μ l de cDNA y por último se colocaron los tubos en el termociclador cuando éste tenía 94°C y se corrió el siguiente programa:

1. 94 °C por 6 minutos
2. 55 °C por 2 minutos

3. 72 ° C por 2 minutos
4. 94 ° C por 45 segundos
5. Se repitió 30 veces el paso 2-4
6. 55 ° C por 2 minutos
7. 72 ° C por 7 minutos
8. 20 ° C 1 hora
9. Fin

Se guardaron los productos de PCR en refrigeración hasta su uso.

MOLÉCULA	SECUENCIA	PRODUCTO PB
β -actina	3'CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC 5'GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA	406
TNF- α	3'CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC 5'ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC	506
TGF- β	3'GAC CGC AAC AAC GGC ATC TA 5'GGC GTA TCA GGG GGG GTC AC	262

Tabla 3. Lista de oligos empleados en las amplificaciones

Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron en geles al 2% de agarosa con un voltaje de 75, además de emplear sus respectivos marcadores de bajo peso molecular (Facultad de Medicina, UNAM). Se utilizó TBE como buffer de corrida (apéndice). Para confirmar las diferencias en la expresión de RNA para TNF- α y TGF- β , se elaboró un Análisis digital de Imágenes y se realizaron gráficos para la expresión de cada citocina (Gel Doc 1000, Bio-Rad, muchos de los métodos tradicionales para la interpretación de fotografías de geles,

incluyen la inspección visual y la densitometría, los cuales han sido abandonados en favor de software para computadoras).

Evaluación de la bioactividad del TGF- β en las células Mv1Lu

La línea celular Mv1Lu tiene como característica principal inhibir su crecimiento en presencia del TGF- β (Wu et al, 1996). Se cultivaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (NUNCLON, Denmark), 2,500 células/pozo-100 μ l de medio ISCOVE's (Gibco, BRL, USA) suplementado con 10% (v/v) de SFB. A las 24 horas se sustituyó el medio por uno nuevo el cual contenía medio de cultivo completo al 50% de medio condicionado con y sin tratamiento de CasNa. Se consideró un control positivo de 10 ng/ml de mTGF- β y un control negativo de MC de células 32D sin estímulo. Se efectuaron tres repeticiones por condición evaluándose la proliferación celular mediante conteo directo a las 48 horas de cultivo .

Evaluación de la bioactividad del TNF- α en las células L-929

La actividad biológica del TNF *in vitro* se monitorea por la lisis de las células L-929 de ratón, después de la exposición al TNF por 48 horas. La sensibilidad de este ensayo puede ser elevada casi 10 veces con la adición de actinomicina D o mitomicina C, aunque la actinomicina D es más efectiva que la mitomicina C (Aggarwal et al, 1985). Para evaluar la actividad del TNF- α contenida en los medios condicionados de las células 32D tratadas o no con CasNa, se sembraron 3×10^5 células L929/ 0.1 ml de medio de cultivo Iscove's suplementado al 10% con SFB en una placa de 96 pozos de fondo plano (NUNCLON, Denmark) y se mantuvieron en cultivo 12 horas. Después de este tiempo se substituyó el medio por medio nuevo al 50% con el MC de 32D tratadas con CasNa conteniendo 0.5 μ g/ml de actinomicina D como coadyuvante. Se consideraron controles negativos de actinomicina D y MC de 32-D sin estímulo y como control positivo 10 ng/mL de mTNF α , con tres repeticiones por condición y se dejó en condiciones de cultivo por 16 horas evaluándose el porcentaje de sobrevivencia por exclusión de azul tripano.

RESULTADOS

Las células 32D estimuladas con CasNa producen un aumento de RNA mensajero para TNF- α .

El TNF- α y el TGF- β son considerados inhibidores clásicos de la hematopoyesis. De acuerdo con resultados anteriores el CasNa es un inhibidor potente de las células 32D. Con la finalidad de evaluar la hipótesis de que el CasNa induce la expresión de factores inhibidores clásicos de la hematopoyesis como el TGF- β y el TNF- α , se procedió a analizar si las células 32D eran estimuladas a inducir la expresión de los genes para ambas citocinas mediante la técnica de RT-PCR.

Al tener estandarizadas las condiciones para obtener el gen de TNF- α en macrófagos residentes activados (nuestro positivo) se procedió a evaluar la expresión del gen en las células 32D tratadas o no con CasNa en tres tiempos: 36, 48 y 60 horas ya que de acuerdo con nuestros antecedentes la inhibición de la proliferación en las células 32D es más evidente a partir de los tres días (50%), estos tiempos se tomaron para poder observar posibles modificaciones en la expresión del gen.

Los resultados del RT-PCR indican que las células 32D expresan el RNA mensajero para el TNF- α aún sin estímulo con CasNa, sin embargo, la presencia del CasNa aumenta la expresión de este gen ya que las bandas que son producto de la amplificación de los ensayos de 32D + CasNa se encuentran de una manera más intensa que su contraparte sin estímulo (células cultivadas con PBS) (Figura 2). Para confirmar las diferencias en la expresión de RNA para TNF, se elaboró un Análisis digital de Imágenes. De acuerdo al Análisis digital de Imágenes (Gel Doc 1000, Bio-Rad) hay un aumento en la absorbancia en los ensayos estimulados con CasNa y por lo tanto en la concentración del gen para TNF- α , esta expresión tiende a aumentar conforme el tiempo de exposición de las 32-D al CasNa (Figura 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Productos de RT-PCR para TNF- α

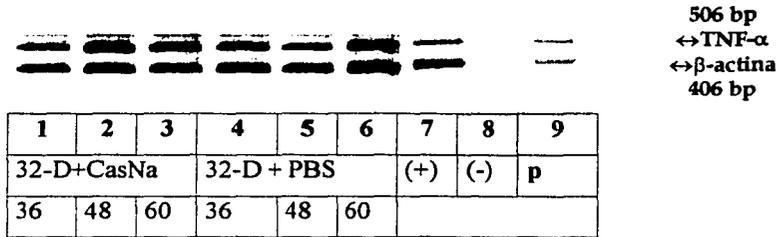


Figura 2. Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación del TNF- α (líneas superiores) (506 bp) fueron analizados en un gel de agarosa al 2%. La amplificación de B-actina (406 bp, líneas inferiores) fue utilizada como control de expresión y estabilidad del RNA. Carril 1, 2 y 3 producto de la RT-PCR de células 32D cultivadas en presencia de CasNa durante 36, 48 y 60 horas respectivamente. Carril 4, 5 y 6 en ausencia de CasNa por 36, 48, 60 horas respectivamente. Carril 7 corresponde al positivo, 8 al negativo y 9 a los marcadores de peso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis digital de Imágenes del producto de la RT-PCR para TNF- α

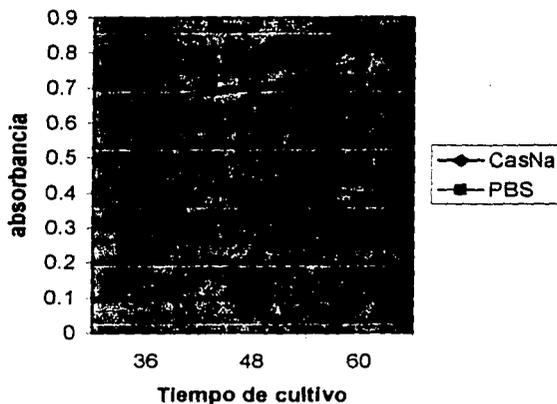


Figura 3. El Análisis digital de Imágenes muestra que hay un aumento en la absorbancia en los ensayos estimulados con CasNa y por lo tanto en la concentración del gen para TNF- α .

Las células 32D estimuladas con CasNa no producen un aumento de RNA mensajero para TGF- β .

De igual manera que con el TNF- α , después de tener estandarizadas las condiciones para obtener el gen de TGF- β , en macrófagos residentes activados (nuestro positivo), se procedió a evaluar la expresión del gen en las células 32D tratadas con CasNa en tres tiempos: 36, 48 y 60 horas. Después de elaborar la técnica de RT-PCR los resultados nos indican que las células 32D expresan los mismos niveles de RNA mensajero para el TGF- β independientemente del estímulo con CasNa. El Análisis digital de Imágenes permitió comprobar que no se presenta aumento en la absorbancia y por lo tanto en la concentración de el RNAm para el TGF- β , aún con el estímulo del CasNa (Figuras 4 y 5).

TESIS SIN
FALLA DE ORIGEN

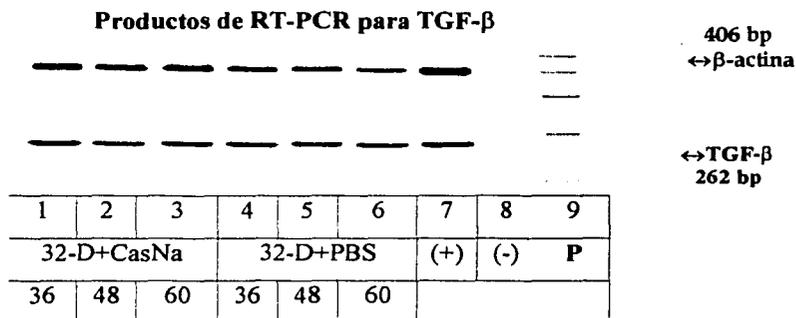


Figura 4. Los productos de RT-PCR obtenidos de la amplificación del TGF- β (líneas inferiores) (262 bp) fueron analizados en un gel de agarosa al 2%. La amplificación de B-actina (406 bp, líneas superiores) fueron utilizados como control de la expresión de RNA. Carril 1, 2 y 3 en presencia de CasNa durante 36, 48 y 60 horas respectivamente, 4, 5 y 6 en ausencia de CasNa por 36, 48, 60 horas respectivamente, 7 corresponde al positivo 8 al negativo y 9 a los marcadores de peso.

Análisis digital de Imágenes para TGF- β

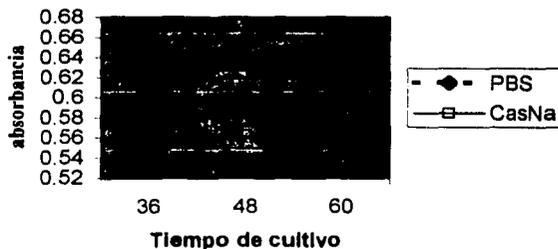


Figura 5. El Análisis digital de Imágenes muestra que no hay un aumento en la absorbancia y por lo tanto en la concentración del gen para el TGF- β con estímulo.

FALLA DE ORIGEN

El medio condicionado de las células 32D presenta actividad de TNF- α pero no de TGF- β .

Considerando que se observó aumento en la expresión de RNAm para TNF- α en células tratadas con CasNa, se consideró pertinente detectar la presencia de la actividad biológica de TNF- α en el sobrenadante de los cultivos de las células 32D tratadas con CasNa, empleando como monitor a la línea celular L-929, la cual es sensible al TNF- α (es citotóxico).

Las células L-929 tratadas con medio condicionado obtenido de 32D estimulados con CasNa y Actinomicina-D, mostraron reducción en la viabilidad celular de hasta un 37% en comparación con las células L-929 tratadas con medio condicionado de 32D sin CasNa y con Act-D o solo Act-D, las cuales presentan un ligero descenso del 10 al 12% respectivamente, el cual es igual al que se obtiene al cultivar las células L-929 con medio fresco. Así se puede decir que el medio condicionado de de 32-D más CasNa tiene actividad de TNF- α , aunque no alcanza los niveles de 10 ng/ml de mTNF- α (figura 6).

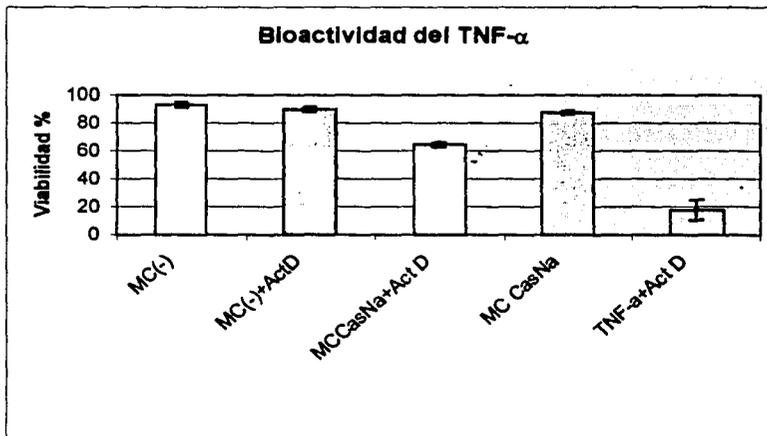


Figura 6. Porcentaje de viabilidad de las células L-929 empleada como monitor para detectar la actividad biológica del TNF- α contenido en los MC de las células 32-D tratadas con CasNa. El TNF- α es citotóxico en L-929; tal actividad se potenció con actinomicina D.

RECIBIDO CON
FALLA DE ORIGEN

Para determinar si en los medios condicionados obtenidos de cultivos de 32D más CasNa presentan actividad biológica tipo TGF- β , se evaluaron estos medios condicionados en presencia de la línea Mv1Lu que es sensible al TGF- β (disminuye la proliferación de Mv1Lu).

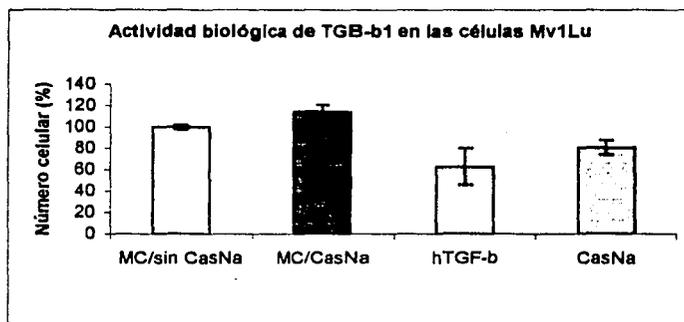


Figura 7. Actividad biológica del TGF- β contenido en los MC de las células 32D tratadas con CasNa, evaluada en la línea celular Mv1Lu la cual inhibe su proliferación en presencia de TGF- β .

Los resultados indican que el medio condicionado de 32D tratada o no con CasNa no tienen actividad biológica de TGF- β a pesar de que se observa un importante descenso cuando se utiliza el TGF- β recombinante (el descenso llega hasta un 50%) (Figura 7).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discusión.

La hematopoyesis es un proceso de renovación celular, que permite la continua generación de un gran número de tipos celulares maduros, a partir de un reducido número de células. Una compleja pero eficiente red regulatoria es necesaria para controlar esta producción y mantener el tejido hematopoyético en homeostasis. Durante las últimas tres décadas un gran número de moléculas de crecimiento envueltas en esta regulación han sido identificadas (Fortunel *et al*, 2000), a las cuales se les conoce como factores de crecimiento hematopoyético (FCH) e interleucinas miembros de la familia de las citocinas, sin embargo, existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta que afectan la proliferación de las células hematopoyéticas. Este conjunto de datos sugiere que la hematopoyesis es regulada por múltiples vías, algunas de ellas poco exploradas, pero que pueden tener gran impacto en la terapia de problemas hemato-oncológicos. Por ello es necesario identificar y estudiar a profundidad cada una de las alternativas de modulación para así tener una visión más integral de la biología básica de la hematopoyesis, la cual permita establecer bases sólidas para mejorar las estrategias en la resolución de problemas hematológicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las células 32D tratadas o no con CasNa expresan tanto el gen para el TNF- α como para el TGF- β , también se observa un incremento en la expresión de RNAm para TNF en aquellas células tratadas con CasNa, dato que es confirmado de acuerdo a un análisis digital de imágenes, en contraste el gen para el TGF-B permaneció sin cambios a pesar del estímulo con CasNa. Cuando se evaluó la presencia de actividad biológica de TNF- α y TFG- β , solo se encontró actividad de TNF, lo cual sugiere que el CasNa además de incrementar la expresión del RNAm para TNF, también induce la liberación de la proteína bioactiva.

A pesar de la extensa caracterización celular y física de las células tallo poco se conoce de su naturaleza molecular (Philips *et al*, 2000). La expresión basal de genes para citocinas inhibitoras como el TNF- α y el TGF- β en las células 32D, sumado a la detección de RNA

mensajero para varias citocinas reguladoras en células CD34+ de médula ósea normal (Majka *et al*, 2001), sugiere que las células precursoras hematopoyéticas tienen la capacidad de expresar citocinas, una característica molecular poco estudiada en este grupo de células. Por otro lado, aunque en el trabajo de Majka se menciona la presencia del RNAm para el TNF- α y TGF- β , no se muestran los datos de RT-PCR y de actividad biológica, y además los mismos autores discuten la posibilidad de que las células CD34+ puedan estar contaminadas con monocitos u otras células maduras las cuales podrían ser responsables de la producción de estos factores inhibidores. Nuestro trabajo, al emplear una población celular homogénea, como lo es la línea celular mieloide multipotencial 32D, demuestra contundentemente que las células primitivas hematopoyéticas efectivamente expresan genes de TNF- α y TGF- β .

Considerando nuestros resultados y sumados a los de Majka sugieren la hipótesis de que la célula primitiva hematopoyética podría estar preparada para regularse por si misma, aunada a la participación de citocinas liberadas por las células estromales, esto en principio parece un exceso, sin embargo considerando que la hematopoyesis es fundamental para el sistema inmune, es evidente la necesidad de un riguroso control de la génesis de los leucocitos.

En cuanto a las investigaciones realizadas con CasNa y su posible influencia en la hematopoyesis, desde hace algunos años surgen las primeras evidencias de la participación de la caseína (la proteína más abundante de la leche) en la hematopoyesis. Algunos trabajos indican que activa a los leucocitos ya que al inyectar CasNa, por vía intraperitoneal, en ratones o peces inducen una respuesta inflamatoria, promoviendo inicialmente la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal (Passotti *et al*, 1993; Aranishi *et al*, 1997). Incluso se ha reportado un incremento de la concentración de citocinas tipo factor estimulador de macrófagos (M-CSF) y de granulocitos (G-CSF), tanto en el suero como en el fluido de la cavidad peritoneal de ratones inyectados con CasNa (Lotem *et al*, 1985). Como se ve existen evidencias que sugieren que el CasNa induce la

acumulación de factores positivos para la hematopoyesis, sin embargo, en un trabajo realizado en este laboratorio se encontró que el caseinato de sodio reduce la proliferación de las células 32D, por lo que según los autores el caseinato de sodio es otro modulador negativo de la hematopoyesis (Ramos *et al*, 2000). En esta tesis, por primera vez se muestra que el CasNa induce incremento en la expresión del gen para el TNF así como la liberación de la proteína bioactiva. Considerando nuestros datos y que el TNF- α es un clásico inhibidor de la hematopoyesis (Ware *et al* 1992; Hsu *et al* 1999), existe la posibilidad de que el CasNa inhiba la proliferación de la célula 32-D vía la producción de TNF. Evidentemente faltaría comprobar si esta citocina es en realidad la causante de esta disminución de la proliferación así como explicar que manera el CasNa estaría induciendo la liberación del TNF- α activo.

Por otro lado, aunque no se encontró diferencia en la expresión del gen para el TGF- β al nivel de RNA, la presencia de RNAm sugiere que esta vía esta disponible para activarse en cuanto reciba el estímulo adecuado. La ausencia de TGF- β bioactivo en el sobrenadante de las células 32D tratadas con CasNa puede deberse a la ausencia de la síntesis de proteína. La otra posibilidad es que esté la proteína pero en forma inactiva ya que para su activación se requiere de un proceso de 2 pasos: el primero es un corte que permite la eliminación de un péptido hidrofóbico señal, en la región N-terminal de la proteína precursora, dejando un pro-TGF- β . El segundo es un corte que permite la separación de la pro-región de la proteína del TGF- β maduro (Fortunel *et al*, 2000). De cualquier forma al parecer el CasNa no es capaz de inducir la liberación de TGF bioactivo.

Finalmente, este estudio realizado *in vitro* sugiere una nueva alternativa de modulación de la hematopoyesis a base de proteínas de la leche y que puede sumarse a la mediada por citocinas, hormonas y neuropéptidos, estos datos son de utilidad para ampliar el conocimiento básico de la hematopoyesis.

CONCLUSIONES

La línea celular hematopoyética multipotencial 32D, expresa de manera constante los genes para dos inhibidores clásicos de la hematopoyesis como el TGF- β y el TNF- α .

El CasNa induce un aumento en la expresión del gen para el TNF- α en las células 32D.

El medio condicionado de las células 32D tratados con CasNa tiene TNF- α bioactivo.

Comentarios finales.

Los avances obtenidos en el desarrollo de esta tesis, permiten establecer que el CasNa induce la liberación de TNF- α bioactivo, aunque para tener una idea de la concentración que se encuentra en los medios condicionados es recomendable la realización de ensayos de ELISA.

Por otro lado, considerando que el CasNa induce la liberación de TNF- α en las células 32D y que este factor es uno de los clásicos inhibidores de la hematopoyesis, se considera que se tienen las condiciones propicias para evaluar la posibilidad de que el TNF- α sea el responsable de la inhibición de la proliferación de las células 32D tratadas con CasNa. El uso de un anticuerpo anti-TNF- α ayudará a delucidar la respuesta. De esta forma se describiría el posible mecanismo de inhibición de la hematopoyesis activada por la adición de CasNa. Evidentemente no se debe descuidar la posibilidad de la liberación de inhibidores hematopoyéticos como el MIP-1- α , IFN y NO, lo cual no sería nada extraño ya que el grupo de Majka lo ha evidenciado.

Por último los datos obtenidos demuestran que el CasNa esta presentando un efecto biológico en las células 32D de ahí que trabajos que identifiquen como actúa la molécula en estas células serían necesarios posteriormente.

APÉNDICE

Agua tratada con dietilpirocarbonato:

Se disuelven 0.2 ml de dietilpirocarbonato en 100 ml de agua miliQ y se deja toda la noche en agitación a 37°C, con la finalidad de homogenizar la solución. Al siguiente día se esteriliza en autoclave.

Buffer salino de fosfatos (PBS 1X para 1L):

NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
KH ₂ PO ₄ monobásico	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄ dibásico	2.16 gr

Buffer TBE (para 5L):

Tris base	54 gr
Ácido Bórico	27.5 gr
EDTA pH8	0.5 M (10 ml)

Llevar a cinco litros de agua

Bibliografía.

- Abbas A K, Andrew H L, Jordan S P. (1996). Inmunología celular y molecular. Ed. Interamericana Madrid. pp. 276-281.
- Aggrawal B B and Kohr J W. 1985. Human tumor necrosis factor. In: DiSabato G, ed. Methods in enzymology. New York: Acad Press. 116: 441-448.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Keith R, Watson D J. (1996). La célula. Ed. Interamericana. Madrid. pp. 301.
- Aranishi F, Hara K, Osatomi K, Ishihara T.(1997). Cathepsins B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. Comp Biochem Physiol. 117: 605-11.
- Aschkenasy A. (1971). Effets comparés de la caséine et de divers melanges aminoacides sur la restauration de lérythropoïése, de la neutropoïése et de la lymphopoïése chez des rats préparés par une privation prolongée de protéines. Nouvelles études. Arch Sci Physiol. 25: 415-30.
- Batard P, Monier M N, Fortunel N, Ducos K, Sanssilvestri-Morel P, Pan T H, Hatzfeld A and Hatzfeld J A.. (2000). TGF-B maintains haematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen upmodulation. J Cell Sci. 113: 383-90.
- Bendzten K. (1994). Cytokines and natural regulators of cytokines. Immunol Letters. 43: 111-23.
- Beyaert and Fiers Walter (1998). Tumor necrosis factor and lymphotoxin: Mire-Sluis and Thorpe. Cytokines. Ed. American Press, USA. pp. 335-351.
- Bharat B A, Jordan V G. (1992). Human cytokines. Blackwell Scien Pub. USA. pp. 448.
- Breitman T, Chen Z, and Takahashi N. (1994). Potential applications of cytodifferentiation therapy in hematologic malignancies. Sem Hematol. 31:18-25.
- Carswell E A, Old L J, Kassel R L, Green S, Fiore N, Williamson B. (1975). An endotoxin induced serum factor causes necrosis of tumor. Proc Natl Acad Sci. 72: 3666-3620.
- Chávez G M A. (1997). Purificación del FIP y evaluación de su efecto en el ciclo celular de fibroblastos de cervix Humano. Tesis Licenciatura, UNAM, Biología

Fes-Zaragoza; México, D.F. 65.

- De Larco J E and Torado G J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc Natl Acad Sci. 75: 4001-4006.
- Durum S K and Muegge K. (1998). Cytokines Knockouts. Human Presss New Yersey. pp: 369-71.
- Fortunel N O, Hatzfeld A, and Hatzfeld J A. (2000). Transforming growth factor-B: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. Blood. 96: 2022-2036.
- Greenberger J, Sakakeeny M, Humphries R, Eaves C, and Eckner R. (1983). Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erytroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. Proc Natl Acad Sci USA. 80: 2931-2935.
- Gordon M and Barret A. (1985). Bone marrow disorders; the biological basis of clinical problems: Chapter 2; Haematopoietic precursor cells. Blackwell Sci Publ. London. pp:20-59.
- Hall C. (1971). Drying of milk and products. 2da Edition. The Avi Pub Company. Inc USA. pp. 185-186.
- Henrick H C, Bengt W Y. (1989). Growth factors as transforming proteins. J Biochem. 184: 487-496.
- Hsu H C, Tssai W H, Chen P G, Hsu M L, Ho C K, Gang S Y. (1999). In vitro effect of granulocyte-colony stimulating factor and all-trans retinoic acid on the expression of inflamatory cytokines and adhesion molecules in acute promyelocytic leukemic cells. Eur J Haematol. 63: 11-18.
- Humphries R, Eaves A, and Eaves C. (1981). Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation *in vitro*. Proc Natl Acad Sci. USA. 78: 3629-3633.
- Jacobsen S E, Ruscetti F W, Ortiz M, Gooya J M, Keller J R. (1994). The growth response of Lin-Thy-1+ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy of multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. Exp Hematol. 22: 985-989.
- Janeway-Travers (1997). Immunobiology the immune system in health and disease. Third edition. Garland Publishing. New York and London. pp.980.

- Karp G. (1996). *Biología Celular Molecular*. Ed. American Press. USA. pp. 671-692.
- Kim YS, Yi Y, Choi SWG, Kim SJ. (1999). Development of TGF-beta, resistance during malignant progression. *Arch Pharm Res*. 22: 1-8.
- Kloen P, Mark C G, Andrew E R, Dompsey S S, Letre I G, Henry J M (1997). Expression of TGF-B isoforms in Sarcomas. *Am Can Soc*. pp. 2230-2239.
- Kovacs E J, Radzioch D, Young H A Y and Veresio L. (1998). Differential inhibition of IL-1 and TNF-alpha mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages. *J Immunol* 141: 3101-3106.
- Lange W. B, Rosenthal L F M, Lindermann K A. (1992). The role of cytokines in Oncology. *Clin Exp Hematol*. 1: 13-19.
- Lloyd J O. (1984). El factor de necrosis tumoral. *Investigación y ciencia*. Madrid. 142. pp: 29-37.
- Lotem J, and Sachs L. (1985). Independent regulation of mieloid cell growth and differentiation inducing proteins *in vivo*: regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer*. 35: 93-100.
- Maciejewsky J P, Selleri C, Sato T, Cho H J, Keefer L K, Nathan C F, Young N S. (1995). Nitric oxide supression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-g and tumor necrosis factor-a. *J Clin Inv* 96: 1085-1092.
- Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska M A, Gerwitz A M, Emerson S G, and Ratajczak M Z. (2001). Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34⁺ cells, myeloblasts, erythoblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 97: 3075-3084.
- Margni R. (1996). *Inmunología e Inmunoquímica*. Ed. Médica Panamericana, México. pp. 680.
- Mayani V H. (1999). Las células seminales del sistema hematopoyético: Soto C.I., Cacéres R. J., Mendoza F.J., Weiss S.B.(eds.). *Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: Mecanismos celulares y moleculares*. México, Plaza y Valdés Editores. pp. 15-33.

- Meager A. (1991). Cytokines. Ed Prentic Hall, USA. pp. 1-8.
- Metcalf D. (1998). Cell-cell signaling in the regulation of blood cell formation and function. *Inmunol Cell Biol.* 76: 441-447.
- Metcalf D and Moore M. (1971). Hematopoietic cells. *Frontiers of biology* . Vol 24. North Holland Publishing Company. Amsterdam.
- Molema H, Hermes R, Wanebo H, Reichner J, Hockstra H. (1999). The effect of surgical wounding on tumor development. *Eur J Surg Oncol.* 25: 231-43.
- Morrison S, Uchida N, and Weissman I. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11: 35-71.
- Okano M, Hideki O, and Sasaki Ryuzo. (1992). Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J Nutr.* 122: 1376-1383.
- Ogawa M, Matsunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Ann N.Y. Acad Sci.* 872:17-23.
- Passotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G. (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol.* 2: 71-81.
- Philips R L, Ernst R E, Brunk B, Ivanova N, Mahan M A, Deanehan J K, Moore K A, Overton G C, Lemischka I R. (2000). The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science.* 288: 1635-1640.
- Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. 2000. El caseinato de sodio (CasNa) induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Invest Clin.* 52:638-644.
- Richards S M, Richard D G, Lynne K, Brian K, Jhon M M. (1998). Prolactin is an antagonist of activity and promotes proliferation of murine B cell hybridomes. *Cell Immunol.* 184: 85-91.
- Ruscetti W F, Birchernall-Roberts, McPherson M J, Wiltrout R H. (1998). Transforming growth factor β_1 : Mire-Sluis and Thorpe. *Cytokines.* Ed. American Press, USA. pp. 415-432.
- Rusten L S, Jabobsen W F, Lesslauer W, Loetscher H, Smeland B E, Jacobsen W E. (1994). Bifunctional effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement

of p55 and p75 TNF receptors. *Blood*. 83: 3152-3159.

- Santiago E, Mora L, Montecinos J, Ventura J, Machuca C, Mendoza J. (1994). Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblasts. *Rev Invest Clin; Suplemento 1*: 253.
- Santos A L. (1994), Principios básicos de la respuesta inmunológica. *Perinatol Reprod Human*. 8: 4-11.
- Walstra P, and Jenners R. (1989). *Dairy chemistry and physics*. John Wiley Sons, New York. pp: 106.
- Ware C F, Crowe P D, Grayson M H, Androlewicz M J, Browning J L. (1992). Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol*. 149: 3881-3888.
- Wu F, Buckley S, Bui K C, Yee A, Wu Hy, Liu J, Warburton D. (1996). Cell cycle arrest in G₀/G₁ phase by contact inhibition and TGF-beta-1 in mink Mv1Lu epithelial cells. *Am J Physiol*. 270(5 pt 1): 877-888.
- Yoshikawa H, Sakihama T, Nakayima Y, and Tasaka K. (1996). Costimulation of fibronectin promotes FcγR-mediated rescue of IL-3-dependent bone marrow-derived cells from apoptosis. *J Immunol*. 156: 1832-1840.
- Zambrano-Ramírez I R, Santiago O E, Weiss S B, Cáceres C R. (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev Inv clin*. 51:53-66.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN