



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL LINAJE MONOCITO-
MACRÓFAGO (Fc γ MaR, M-CSF, GM-CSF Y SUS RECEPTORES)
EN CÉLULAS MIELOIDES TRATADAS CON CASEÍNAS”.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA:

BRENDA MIREYA MELO NAVA

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO



MÉXICO, D. F.



2004

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Melo Nava Brenda Mireya
FECHA: 13 Mayo 2004
FIRMA: Melo Nava Brenda M.

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Modulación de la Expresión de genes del linaje monocito-macrófago (FcγR, M-CSF, GM-CSF y sus receptores) en células mieloides tratadas con caseínas".

realizado por **MELO NAVA BRENDA MIREYA**

con número de cuenta **9501870-8**, quien cubrió los créditos de la carrera de:
BIOLOGÍA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario **Dr. Edelmiro Santiago Osorio**

Propietario **Dr. Luis Felipe Jiménez García**

Propietario **Dr. Alfonso José Vilchis Peluyera**

Suplente **Dr. Víctor Manuel Valdés López**

Suplente **M. en C. Sara Teresa Méndez Cruz**

Consejo Departamental de
Biología

M. C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

**“MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DEL LINAJE
MONOCITO-
MACRÓFAGO (FcγR, M-CSF, GM-CSF Y SUS
RECEPTORES)
EN CÉLULAS MIELOIDES TRATADAS CON CASEÍNAS”.**

DEDICATORIAS

A mi papá Dios de quién proviene el conocimiento y la inteligencia

*“Cuando la sabiduría entra a nuestro corazón,
y la ciencia es grata a nuestra alma,
la discreción nos guarda
y nos preserva la inteligencia”.*

*“Sabiduría ante todo, adquiere sabiduría;
y sobre todas tus posesiones adquiere inteligencia”.*

A mi valiosa Madre por su incondicional cariño y apoyo.

A la memoria de mi Padre (†).

A mis perseverantes Hermanos por su comprensión y estímulos.

*A esa linda persona que constantemente me motiva y me demuestra
su amor.*

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. <u>ABREVIATURAS</u>	3
II. <u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	5
III. <u>RESUMEN</u>	6
IV. <u>INTRODUCCIÓN</u>	7
1. Hematopoyesis	
1.1 Células hematopoyéticas	7
1.2 Regulación de la hematopoyesis por citocinas	9
1.3 Hematopoyesis y leucemia	11
2. Factor estimulador de colonias de macrófagos	
2.1 Factor estimulador de colonias de macrófagos	13
2.2 Regulación génica	13
2.3 Receptor al factor estimulador de colonias de macrófagos	14
2.4 Ruta de señalización	15
2.5 Función biológica del M-CSF	17
3. Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos	
3.1 Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos	18
3.2 Regulación génica	18
3.3 Receptor al factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos	19
3.4 Ruta de señalización	20
3.5 Función biológica del GM-CSF	21
4. Receptores Fc gamma	
4.1 Diversidad estructural de receptores FcRs	22
4.2 Estructura de Fc γ Rs	23

4.3 Receptor de alta afinidad Fc γ RI (CD64)	23
4.4 Receptor de baja afinidad Fc γ RII (CD32)	25
4.5 Receptor de baja afinidad Fc γ RIII (CD16)	27
4.6 Ruta de Señalización	28
5. Caseínas	
5.1 Contenido proteico de la leche	30
5.2 Miscelas de caseínas	30
5.3 Estructura de las caseínas	31
5.4 Actividades biológicas	31
5.5 Caseínas y hematopoyesis	32
<u>V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	34
<u>VI. JUSTIFICACIÓN</u>	35
<u>VII. HIPÓTESIS</u>	36
<u>VIII. OBJETIVOS</u>	37
<u>IX. MATERIALES Y MÉTODO</u>	38
<u>X. RESULTADOS</u>	43
<u>XI. DISCUSIÓN</u>	50
<u>XII. CONCLUSIONES</u>	54
<u>XIII. BIBLIOGRAFÍA</u>	55
<u>XIV. ANEXO</u>	60

I. ABREVIATURAS

ACCD	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AML	Leucemia mieloide aguda
APCs	Células presentadoras de antígenos
ARAMs	Motivos de activación del receptor al antígeno
BCR	Receptor de células B
CasNa	Caseinato de sodio
CBP	Proteína de unión a CREB
c-fms	Receptor al factor estimulador de colonias de macrófagos
CLE	Elemento conservado de linfocina
CFU	Unidades formadoras de colonias
CSF	Factor estimulador de colonias
DCs	Células dendríticas
DAG	Diacilglicerol
EGF	Factor de desarrollo de epitelios
EPO	Eritropoyetina
FcγR	Receptor Fc gamma
FcγRI (CD 16)	Receptor Fc gamma tipo I
FcγRI (CD 32)	Receptor Fc gamma tipo II
FcγRII (CD 64)	Receptor Fc gamma tipo III
FGF	Factor de desarrollo de fibroblastos
FIRE	Elemento regulador intrónico del Fms
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos – macrófagos
GM-CSFR	Receptor al factor estimulador de colonias de granulocitos – macrófagos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HSC	Células tallo hematopoyéticas
JAK	Janus cinasas
JH	Dominio de homología Janus
ICs	Complejos inmunes
IL-	Interleucina
INFγ	Interferón gamma
IP3	1, 4, 5 trifosfato de inositol
ITAM	Motivo activador de tirosina del inmunoreceptor
ITIM	Motivo inhibidor de tirosina del inmunoreceptor
LT-HCS	Células tallo hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo

M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MIP-1α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
MPP	Células progenitoras multipotenciales
mRNA	RNA mensajero
NO	Óxido nítrico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PTKs	Fosfotirosina cinasas
SCF	Factor estimulador de células tallo
SH	Sitios de homología Src
SHIP	Fosfatasa de inositol
SHP	Fosfatasa de tirosina
Src	Dominios de unión a fosfotirosinas
ST-HSC	Células tallo hematopoyéticas reconstituyentes a corto plazo
STAT	Transductores de señal y activadores de transcripción
TCR	Receptor de células T
TH	Linfocitos T cooperadores
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPO	Trombopoyetina

II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
Figura 1. <i>Linaje celular del sistema hematopoyético.</i>	8
Figura 2. <i>Modelo de la transducción de señales del M-CSF.</i>	16
Figura 3. <i>Modelo de la transducción de señales del GM-CSF.</i>	21
Figura 4. <i>Estructura de los receptores FcγR.</i>	24
Figura 5. <i>Modelo de la transducción de señales de los ITAMs e ITIMs.</i>	29
Figura 6. <i>Efecto del CasNa, α-, β- y κ- caseína en la proliferación de las líneas celulares 32D y WEHI3.</i>	43
Figura 7. <i>Efecto del CasNa, α-, β- y κ- caseína en la viabilidad de las líneas celulares 32D y WEHI3.</i>	44
Figura 8. <i>Coamplificación del gen de β-actina y del M-CSF usando CasNa, α-, β- y κ- caseína como estímulo en las líneas celulares 32D y WEHI3.</i>	45
Figura 9. <i>Efecto del CasNa, α-, β- y κ- caseína en la expresión del mRNA del gen del c-fms en las líneas celulares 32D y WEHI3.</i>	45
Figura 10. <i>Efecto del CasNa, α-, β- y κ- caseína en la expresión del mRNA del gen del GM-CSF en las líneas celulares 32D y WEHI3.</i>	46
Figura 11. <i>Efecto del CasNa, α-, β- y κ- caseína en la expresión del mRNA del gen del GM-CSFRα en las líneas celulares 32D y WEHI3.</i>	47
Figura 12. <i>Efecto del CasNa en la expresión del mRNA de los genes FcγR en las líneas celulares 32D y WEHI3.</i>	48
Figura 13. <i>Efecto del INFγ, CasNa, α-, β- y κ- caseína en la expresión del mRNA de los genes FcγR en las líneas celulares 32D y WEHI3.</i>	48
Tabla 1. <i>Efectos de las citocinas en la hematopoyesis.</i>	11
Tabla 2. <i>Secuencias de oligonucleótidos.</i>	42

III. RESUMEN

Datos recientes en este laboratorio mostraron que la α -, β -, κ - caseína y su sal, el caseinato de sodio (CasNa), modulan la hematopoyesis, ya que al adicionarse al cultivo de la línea hematopoyética normal 32D disminuyen su proliferación e inducen su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago, mientras que en la línea leucémica mielomonocítica WEHI3 disminuyen su proliferación.

Tomando en cuenta que la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago es desarrollada por la expresión de los genes M-CSF y GM-CSF a través de sus respectivos receptores, se determinó el efecto del CasNa y de la α -, β - y κ - caseína en la expresión del mRNA de estos genes en células 32D y WEHI3. Para contar con un parámetro de diferenciación funcional macrófagica, también se determinó la expresión de los receptores Fc γ Rs.

Los resultados muestran que cada caseína estimuló la expresión del gen M-CSF y su receptor, así como de la subunidad alfa del receptor a GM-CSF, las isoformas Fc γ RIIB1 y Fc γ RIIB2 en la línea 32D. Mientras que la línea WEHI3 parece presentar problemas para expresar el M-CSF y su receptor, ya que no se detectaron aún en presencia de las caseínas. Por otra parte, se observó un efecto estimulante del CasNa y las caseínas en la expresión de GM-CSFR α y las isoformas Fc γ RIIB1 y Fc γ RIIB2 en WEHI3. Bajo nuestras condiciones de cultivo, no se detectó efecto modulador de las caseínas y el CasNa en la expresión del GM-CSF, Fc γ RI y Fc γ RIII en ambas líneas celulares

La inducción de las caseínas en la expresión de los genes del M-CSF, cfms, GM-CSFR α y las isoformas Fc γ RIIB1 y Fc γ RIIB2 en la línea 32D, es congruente con la diferenciación inducida por el CasNa. Mientras que el efecto de las caseínas es diferente en la línea WEHI3 ya que no se observa la expresión del M-CSF y de su receptor, lo que podría deberse al desarrollo de la malignidad en esta línea leucémica.

Debido a lo anterior, surge la necesidad de seguir investigando los mecanismos por los cuáles el CasNa y las caseínas son capaces de modular la hematopoyesis, ya que si pudieran causar diferenciación en células mieloides, esto podría ser de utilidad terapéutica en pacientes con problemas inmunohematológicos.

IV. INTRODUCCIÓN

1. HEMATOPOYESIS

1.1 Células hematopoyéticas

Las células sanguíneas derivan de un tipo de células llamadas tallo hematopoyéticas (HSC), en un proceso de compromiso de linaje, proliferación y diferenciación celular conocido como hematopoyesis. Este proceso se inicia desde la embriogénesis en el saco vitelino, hígado, bazo y continúa durante la vida adulta en la médula ósea (Zambrano *et al*, 1999).

Las células tallo representan 0.01-0.005% de todas las células presentes en la médula ósea; se ha estimado que en humanos normales hay aproximadamente 50 millones de HSC, las cuáles pueden producir hasta 10^{13} células sanguíneas maduras en un intervalo de vida normal. Las HSC no sólo poseen una alta capacidad de proliferación, sino también de autorenovación y diferenciación, ya que originan todos los linajes hematopoyéticos (Smith, 2003). En condiciones normales la mayoría de las HSC se encuentran quiescentes (fase G0 del ciclo celular) y se dividen solo para mantener el estado de la hematopoyesis o la demanda de progenitores en el organismo (Hao *et al*, 1996., Kaufman *et al*, 2001., Mayani, 2003).

Utilizando anticuerpos de superficie para las HSC de ratón se ha logrado la identificación de las células tallo hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo (LT-HSC) con inmunofenotipo $\text{Thy1.1}^{\text{lo}}\text{Lin}^{\text{-}}\text{Sca}^{\text{+}}\text{c-kit}^{\text{+}}$, y en humano como $\text{Thy1.1}^{\text{lo}}\text{Lin}^{\text{-}}\text{CD34}^{\text{+}}\text{CD38}^{\text{-}}\text{CD90}^{\text{+}}$, quienes poseen una alta capacidad de auto renovación durante toda la vida del organismo. También se han identificado a las células tallo hematopoyéticas reconstituyentes a corto plazo (ST-HSC) que son $\text{Thy1.1}^{\text{lo}}\text{Lin}^{\text{-}}\text{Mac}^{\text{lo}}\text{Sca}^{\text{+}}\text{c-kit}^{\text{+}}$, quienes conservan su capacidad de auto renovarse por un período cercano a las 8 semanas o de diferenciarse a células progenitoras pluripotenciales (MPP) con inmunofenotipo $\text{Thy1.1}^{\text{lo}}\text{Lin}^{\text{-}}\text{Sca}^{\text{+}}\text{c-kit}^{\text{+}}\text{Mac}^{\text{lo}}\text{CD4}^{\text{lo}}$, quienes a su vez, pueden diferenciarse y dar origen a células de oligolinajes; perdiendo la capacidad de autorenovarse pero dando origen a las células progenitoras del linaje linfóide y a

células progenitoras del linaje mieloide (Figura 1) (Hawley & Sobiesky, 2003., Weissman *et al*, 2001).

Las células comprometidas hacia determinado linaje, también conocidas como unidades formadoras de colonias (CFU) pueden ser de granulocitos (CFU-G), eritroides (CFU-E), megacariocitos (CFU-MK), granulocito-macrófagos (CFU-GM), células B (CFU-preB), etc., son las células que darán origen a las progenitoras maduras, dependiendo del linaje al que pertenecen. Si pertenecen al linaje linfóide originarán a las células B, T y naturales asesinas cuya función es participar en la respuesta inmune, mientras que en el linaje mieloide generarán a los eritrocitos, que se encargan del transporte de oxígeno; las plaquetas, que participan en la coagulación sanguínea; los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y monocitos, quienes también intervienen en la respuesta inmune (Mayani, 2003).

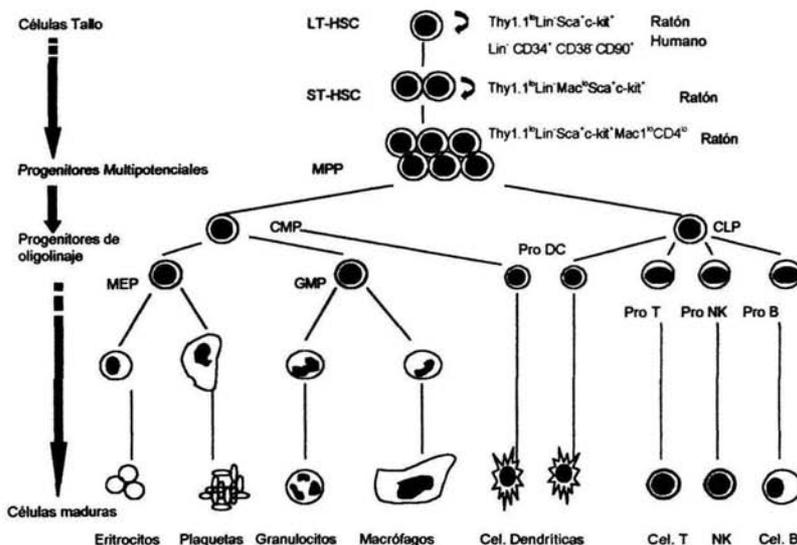


Figura 1. Linaje celular del sistema hematopoyético (Tomado y modificado de Passequé *et al*, 2003). Las células tallo pueden dividirse en células altamente renovadoras por un intervalo de tiempo indefinido (LT-HSC) o en células que son capaces de renovarse durante un tiempo determinado (ST-HSC), quienes a su vez, pueden diferenciarse en células progenitoras multipotenciales (MPP) y finalmente originar células progenitoras linfoides (CLP) quienes dan origen a linfocitos T, B y células naturales asesinas, mientras que las células que dan origen a las células maduras del linaje mieloide son las células progenitoras mieloides (CMP).

1.2 Regulación de la hematopoyesis por citocinas

La diferenciación de las células progenitoras hacia células especializadas es controlada por citocinas hematopoyéticas o factores de desarrollo que son producidos en la médula ósea (Zhu & Emerson, 2002). En la médula ósea se localizan distintos tipos de células estromales, tales como fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipocitos quienes son los encargados de producir citocinas y crear el microambiente propicio para la hematopoyesis (Tabla 1) (Zambrano *et al*, 1999).

Las citocinas son moléculas de naturaleza proteica que interactúan en las poblaciones de células inmunes inmaduras potenciando su maduración y proliferación a través de la unión a receptores específicos de membrana (Aguirre de Ávalos *et al*, 2002). Estas moléculas presentan retro-regulaciones positivas y negativas entre sí y por lo general no actúan solas sino con otras citocinas, producidas por la misma célula pudiendo inducir, potenciar o inhibir la producción de citocinas y modular negativa o positivamente los efectos de dichas citocinas (Sachs, 1996). Por otra parte, al actuar sobre diferentes tipos celulares pueden ejercer múltiples efectos (pleiotrópicas) e igualmente compartir muchos de ellos (Aguirre de Ávalos *et al*, 2002).

La familia de citocinas conocidas como factores estimuladores de colonias (CSF) se involucra en la progresión normal de células progenitoras hematopoyéticas a su estado terminal diferenciado. Existen cuatro tipos de CSF: interleucina 3 (IL-3 o CSF de multilinaje), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos-macróforos (GM-CSF) (Sachs, 1996).

Las células en su estado más primitivo requieren de la acción concertada del factor estimulador de células tallo (SCF), IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, eritropoyetina (EPO), ligando FLT3/flk2 (FL) y trombopoyetina (TPO), que tienen un efecto positivo para la sobrevivencia y proliferación celular. Para las células progenitoras, sólo la presencia

de factores como IL-3 o TPO es suficiente para su proliferación y diferenciación hacia células maduras. Por otro lado, la regulación negativa de la hematopoyesis está bajo el control de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón gama (IFN γ), factor de crecimiento transformante beta (TGF β), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α), IL-4, IL-10 e IL-13. También se ha incluido al óxido nítrico (NO) dentro de este grupo (Smith, 2003).

CITOCINA (kDa)	ORIGEN	EFECTOS
FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS		
GM-CSF (14-35)	Células T, endoteliales, macrófagos y fibroblastos.	Estimulación de proliferación y diferenciación de precursores mieloides, potencia las funciones de neutrófilos y monocitos maduros (lisis y fagocitosis).
G-CSF (18-22)	Monocitos-macrófagos, células endoteliales, células T, neutrófilos y fibroblastos.	Estimula la proliferación y diferenciación de neutrófilos. Estimula la actividad de PMN maduros.
M-CSF (70-90)	Monocitos, granulocitos, células endoteliales y fibroblastos.	Estimulación de diferenciación a precursores hematopoyéticos hacia la línea monocítica. Funcionalidad de monocitos y macrófagos maduros.
Eritropoyetina (30)	Células intersticiales peritubulares renales, de hígado y macrófagos de médula ósea.	Regula la producción de eritrocitos en condiciones normales y recuperación postanémica.
Trombopoyetina (18-70)	Hígado, riñón y músculo liso. En menor proporción en bazo.	Estimula la proliferación y diferenciación de las células progenitoras megacariocíticas. Aumenta la producción plaquetaria.
INTERLEUCINAS		
IL-1 (15)	APCs	Proliferación, pirógeno, efectos endocrinos, producción de IL-6 y CSF.
IL-2 (15)	Linfocitos Th1	Estimula la proliferación de NK y células B.
IL-3 (25) Multi CS-F	Células T y mastocitos	Estimula la proliferación de distintos linajes celulares: eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos, granulocitos y monocitos.
IL-4 (20)	Linfocitos B y T	En células B, estimula proliferación y cambio de IgE e IgG1
IL-5 (20)	Linfocitos Th2	Sinergiza con IL-3, en células B sinergiza con IL-4, IL-2 y activa la secreción de Igs.
IL-6 (25)	Monocitos y fibroblastos	Actúa como factor crecimiento en células B y activador en células T.
IL-7 (25)	Estroma de médula ósea y Timo	Diferenciación de linfocitos B y T.
IL-8 (6.5)	Granulocitos y Plaquetas	Quimiotaxis de neutrófilos.
IL-9 (30-40)	Linfocitos Th	Activa la proliferación de células Th.
IL-10 (17-21)	Linfocitos Th2	Disminución MHC II, inhibidor de la respuesta inmune.
IL-11(24)	Células T, células B activadas y monocitos	Inhibe la activación del MHC, estimula la producción de células B y la producción de Igs.
IL-13 (10)	Monocitos, macrófagos, algunas células B y mastocitos	Activa a las NK para secretar IFN γ e inhibe la producción de IgE inducida por IL-4.
IL-14	Células T	Induce la proliferación y diferenciación de células B e inhibe la producción de IL-1.
IL-15 (14-15)	Células B y macrófagos	Induce la secreción de IgE.
IL-16 (56)	Células T	Induce la proliferación de células B.
IL-17 (20-30)	Células no linfoides y musculares	Induce la proliferación y diferenciación de la célula NK.
IL-18	Células endoteliales y monocitos	Inmunomodulatoria.

INTERFERONES		
IFN- α (16-27)	Linfocitos	Coestimula la producción de células T, induce la secreción de IL-6, IL-8 y G-CSF.
IFN- β	Fibroblastos y células del amnios	Incrementa la expresión de antígenos de clase I y II HLA, activa NK e induce la producción de IFN γ .
IFN- γ (25)	LTh2, linfocitos citotóxicos, NK y macrófagos	Posee efectos antivirales e inmunomodulatorios.
FACTORES DE NECROSIS TUMORAL		
TNF- α (17)	Fibroblastos, células NK, neutrófilos, astrocitos, células endoteliales y células del músculo liso	Proinflamatorio, antitumoral. Agente neovascularizante y estimulante de la resorción ósea.
TNF- β (25)	Linfocitos T	Estimula neutrófilos.
FACTORES ESTIMULADORES DEL CRECIMIENTO		
TGF- α (5-20)	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales	Induce la proliferación de los progenitores de los granulocitos y de los monocitos, activación de macrófagos, aumenta la producción de leucotrienos en eosinófilos y la actividad tumorigénica de monocitos. Induce la proliferación de granulocitos.
TGF- β (28)	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales	Induce la proliferación de monocitos.
PDGF	Plaquetas	Activación plaquetaria.
FGF	Tejido conectivo	Proliferación de fibroblastos.
EGF	Células de lámina basal epidermal	Crecimiento y diferenciación de epitelios.

Tabla 1. Efectos de las citocinas en la hematopoyesis (Tomado de Aguirre de Avalos *et al*, 2002).

1.3 Hematopoyesis y leucemia

Un evento considerado análogo a la hematopoyesis normal, es la leucemia o cáncer en la sangre. La leucemia es originada en precursores sanguíneos que poseen una indefinida capacidad de proliferación gracias a mutaciones que han ido acumulando. Se cree que este proceso pobremente regulado es parecido a la hematopoyesis normal, ya que las células leucémicas y las hematopoyéticas normales coinciden en la propiedad de autorenovarse y en que el blanco de las células leucémicas son las células HSC, por lo que según el linaje celular que se afecta se clasifican los tipos de leucemia que existen (mieloides o linfoides), las cuáles pueden ser agudas o crónicas (Passegué *et al*, 2003).

Diferentes tipos de translocaciones y aberraciones genéticas son encontradas dentro de las distintas leucemias mieloides y estas, son asociadas a los tipos de células inmaduras que existen en diferentes estados de diferenciación (Sachs, 1996). El origen de las células leucémicas no es del todo comprendido, se especula que las células leucémicas podrían originarse por mutaciones causadas

en sus progenitores o por la expresión selectiva de genes que aumentan su capacidad limitada de autorenovarse (Passegué *et al*, 2003).

La translocación es una de las más frecuentes anomalías asociadas a AML. En el humano se han identificado translocaciones en las proteínas de unión al potenciador (CBFA2, PEBP2 α B) y RUNX1 en el cromosoma 21 y ETO en el cromosoma 8. Mientras que el 95% de pacientes con leucemia crónica poseen el cromosoma Filadelfia, una translocación que sufre el cromosoma 22, lo que produce la proteína quimera BCR-ABL, que se expresa en células sanguíneas, además de que generalmente no expresan la proteína p53 (Di Baco *et al*, 2000., Tenen, 2000).

Las células leucémicas requieren de la absoluta capacidad de propagar la enfermedad por lo que lo hacen mediante su autorenovación y desarrollando mecanismos que evaden la muerte celular programada; aunque sólo un pequeño grupo de células leucémicas son capaces de proliferar extensivamente *in vitro* e *in vivo*. Su crecimiento es independiente de ser restringido por algún factor de desarrollo y son resistentes a apoptosis (Passegué *et al*, 2003., Di Baco *et al*, 2000).

Aunque se está trabajando en la identificación de los mecanismos de transcripción y las vías de transducción de señales involucradas en las decisiones del destino de las HSC y de células leucémicas, se desconoce cómo es que se llevan a cabo estos procesos. El conocimiento de esta información es de vital importancia ya que podría maximizarse el potencial clínico de las HSC en el tratamiento de enfermedades como la leucemia (Tenen, 2000., Hawley & Sobiesky, 2003).

Las citocinas que inducen diferenciación en células hematopoyéticas normales, también pueden inducir a las células leucémicas a diferenciarse a células maduras o dirigir apoptosis, como en el caso de la combinación de quimioterapia con M-CSF en pacientes leucémicos (Hasegawa *et al*, 2000) o el uso combinado de G-CSF y ácido retinoico para inducir madurez en la línea leucémica mielomonocítica WEHI3BD+ (Li & Sartorelli, 1992., Basu *et al*, 2002).

2. FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE MACRÓFAGOS

2.1 Factor estimulador de colonias de macrófagos

El factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) conocido alternativamente como factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), es una citocina específica de linaje, la cuál estimula la sobrevivencia, proliferación y maduración de progenitores monocíticos *in vivo* e *in vitro* (Bost *et al*, 2000; Shouqing *et al*, 2000; Tagoh *et al*, 2002). Su expresión es necesaria para mantener el fenotipo monocítico en la célula, aunque no es suficiente para inducir un compromiso irrevocable a la diferenciación (Pierce *et al*, 1990).

El M-CSF originalmente observado en macrófagos también se expresa constitutivamente en otros tipos celulares como células epiteliales de ovario y del trofoblasto. El M-CSF interactúa con una clase de receptores de alta afinidad expresados específicamente en células del linaje monocítico-macrófago y células endoteliales (DeKoter *et al*, 1998). Durante el desarrollo de ratón es expresado en fagocitos del saco vitelino y su expresión es mantenida durante toda la vida adulta (Tagoh *et al*, 2002).

El M-CSF es un homodímero formado por puentes disulfuro que se sintetiza como proteína transmembranal y es procesada por proteólisis para producir su forma soluble, cuyo peso molecular varía de 70-90 kDa. Se sabe que la porción biológicamente activa del M-CSF consta de 152 aminoácidos en la región amino terminal, aunque, estudios estructurales indican que M-CSF es una molécula que necesita la adición de glucosaminoglicanos para tener actividad biológica (Shouqing *et al*, 2000., Ryan *et al*, 2001).

2.2 Regulación génica

La expresión del M-CSF y su receptor (M-CSFR, CSF-1R o c-fms) se han relacionado con un compromiso de las células precursoras multipotenciales a macrófagos, ya que su expresión está restringida a este linaje (Tagoh *et al*, 2002). Se sabe que la diferenciación hacia macrófago está precedida por la aparición del

receptor en la superficie. Existe la posibilidad que se pueda detectar bajos niveles de mRNA del proto-oncogen c-fms en precursores mieloides, por el contrario, puede no detectarse la proteína en la superficie (Orlic *et al*, 1995). Sin embargo, los progenitores comprometidos de macrófagos toman la decisión de diferenciarse antes de la aparición de c-fms en la superficie celular (Tagoh *et al*, 2002).

La síntesis de M-CSF puede ser inducida por IL-1, TNF α , INF γ , GM-CSF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Por el contrario, las prostaglandinas, glucocorticoides, TGF β y sustancias que logran un aumento de AMPc intracelular inhiben la síntesis de M-CSF (Morris, 1991).

El gen M-CSF humano está compuesto por 10 exones a de largo de 20 Kb en el cromosoma 1p21-p13 cerca de los genes de las amilasas. En ratón este gen está localizado en el cromosoma 3 y es procesado para producir un mRNA de 3922 pb. Se sabe que numerosos elementos conservados, que se encuentran próximos al promotor del gen M-CSF, se encargan de controlar su expresión al formar complejos que se unen al promotor. Un ejemplo, es el complejo BAF de mamíferos que regula la expresión del M-CSF, modificando la estructura de su cromatina en secuencias formadoras de DNA-Z (Liu *et al*, 2001). Estudiando las regiones reguladoras que controlan la expresión del M-CSF, se encontró un fragmento de 774 pb río arriba del promotor que contiene varios elementos reguladores que actúan en *cis* y que resultan ser suficientes para dirigir la expresión de este gen en muchos tejidos en ratón (Abboud *et al*, 2003).

2.3 Receptor al factor estimulador de colonias de macrófagos

El receptor a M-CSF (165 KDa) pertenece a la familia de tirosina cinasas tipo III, posee un dominio de unión al ligando extracelular, que se divide en 5 subdominios tipo inmunoglobulina (Ig) y un dominio intracelular de tirosina cinasa interrumpido por una secuencia de aminoácidos hidrofílicos, que terminan el inserto de cinasa (Shouqing *et al*, 2000).

El gen *c-fms* humano se encuentra en el cromosoma 5q33.3 a lo largo de 60 Kb, está compuesto de 22 exones que producen un mRNA de 3975 pb y su expresión puede inducirse por moléculas como IL-10 (Hashimoto *et al*, 1997). En humano, su transcripción inicia con 2 exones separados por un intrón de 25 Kb. El exón 1 es transcrito sólo en células del trofoblasto y el exón 2 en macrófagos. En ratón la transcripción en el trofoblasto ocurre varios sitios río arriba del sitio de inicio, generando exones que sufren splicing alternativo. El *c-fms* de ratón se encuentra localizado en el cromosoma 18 a lo largo de 26 Kb y produce un mRNA de 3312 pb (Tagoh *et al*, 2002).

El promotor de *c-fms* contiene elementos ricos en purinas que le permiten interaccionar con factores reguladores, como PU.1 y miembros de la familia de Ets. Un ejemplo es FIRE (elemento regulador intrónico del *Fms* o *c-fms*). Este elemento se encuentra río abajo del gen y coopera con el promotor para la adecuada expresión de *c-fms* (Tagoh *et al*, 2002).

2.4 Ruta de señalización

El receptor para M-CSF se activa por unión a este factor, lo que provoca la dimerización del receptor. Los dominios citoplasmáticos de tirosina cinasa del receptor se activan para poder reclutar a proteínas de señalización citoplasmáticas que tienen homología *Scr-2* o dominio de unión de fosfotirosina. En el receptor del M-CSF de humano y ratón se han identificado seis residuos de fosfotirosina en el (Y561/Y559, Y571/Y569, Y699/Y697, Y708/Y706, Y723/Y721 y Y809/Y807) (Yeung & Stanley, 2003., Ridley, 2001).

El residuo Y561/Y559 interactúa con proteínas de la familia de *Src* cinasas, lo cual parece estimular la síntesis de DNA del M-CSF. El residuo Y571/Y569 es requerido para la activación y endocitosis del receptor del M-CSF. El residuo Y699/Y697 se une a la proteína de unión al receptor (*Grb2*). La proteína *Grb2* une al receptor a *Ras*, una cinasa que es regulada por señal extracelular (*ERK*). También se fosforila *Cbl* (una proteína con sitios *SH2*), lo que permite la

asociación de CrkII y la subunidad p85 kDa de PI3K (fosfaditilinositol 3 cinasa), formándose un complejo cuaternario que continúa con la transducción de señales (Husson *et al*, 1997) y permite que PI3K llegue a la membrana para generar IP3 (1, 4, 5 trifosfato de inositol).

Por otra parte, existen datos de que la proteína c-Src mediante sus dominios SH3 también se une a la subunidad adaptadora p85, la cual es rica en prolinas y activa la subunidad catalítica p110 para activar cambios en el citoesqueleto de osteoclastos (Grey *et al*, 2000).

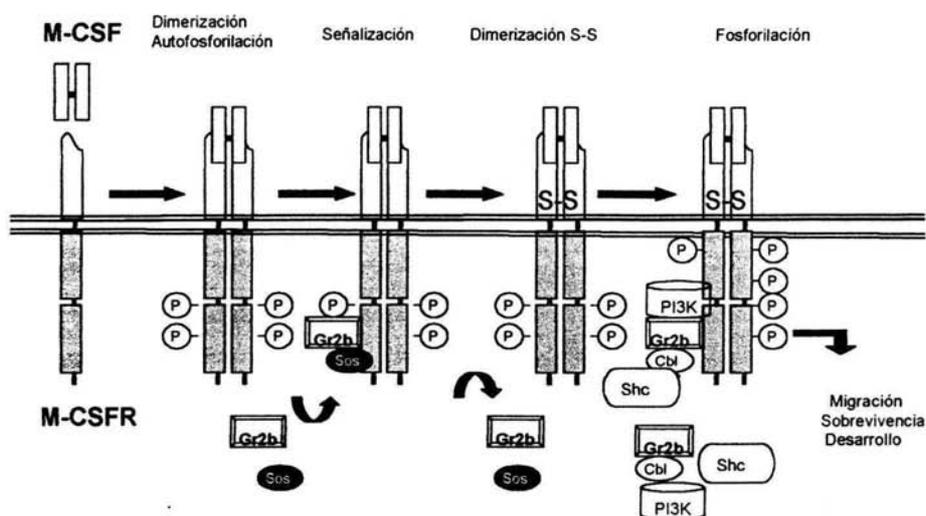


Figura 2. Modelo de la transducción de señales del M-CSF (Tomado y modificado de Yeung & Stanley, 2003). La unión de M-CSF a M-CSFR desencadena la fosforilación del receptor, lo que permite asociarse a Grb2/Sos. La fosforilación de tirosinas en otras moléculas de señalización como Cbl y las subunidades de PI3K hace que Sos se disocie y se forme el complejo con Cbl, PI3K y Grb2.

En la región Y723/Y721 se une PI3K y a PLC γ 2. Una vez que se reclutan proteínas PI3K se traduce una señal antiapoptótica por la interacción PKB/Akt y PLC γ 2 se encarga de mantener el compromiso de la célula en el linaje monocito-macrófago (Ridley, 2001). Mientras que el sitio Y708/Y706 parece estimular a transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT1). Por su parte,

Y809/Y807 se ve involucrado en eventos de mitogénesis en fibroblastos. También hay reportes que dicen que la unión a c-fms incluye la activación de proteínas GTPasas del tipo Shc y SHIP-1. Al parecer el receptor a M-CSF se ve involucrado en vías múltiples y paralelas de señalización que finalmente convergen para lograr la expresión de genes inducidos por el M-CSF, la sobrevivencia y proliferación de la célula (Dey *et al*, 2000).

2.5 Función biológica del M-CSF

Al M-CSF y a su receptor inicialmente se les atribuyó un papel esencial en la implantación trofoblástica y en el desarrollo normal de macrófagos. Sin embargo, estudios recientes sugieren que M-CSF y c-fms también participan en el desarrollo de la glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia, ya que su expresión es regulada por prolactina, insulina y glucocorticoides. Por lo que, ratones osteopétricos homocigotos (op/op) son incapaces de producir leche por que se origina un incompleto desarrollo de la glándula mamaria (Sapi & Kacinski, 1999). En células de la decidua, el M-CSF se encarga de inhibir la expresión de MHC-II inducidas por INF γ , lográndose reducir el riesgo inducido de aborto (Vassiliadis & Athanassakis, 1994).

Los ratones osteopétricos también muestran reducción o ausencia de osteoclastos, macrófagos peritoneales y macrófagos subcapsulares de los nódulos linfáticos, mientras que la producción de fagocitos del bazo, timo, células de Kupffer, alveolares y de la microglia se ve gravemente afectada (Guidez *et al*, 1998). Cuando estos ratones son tratados para que expresen el promotor del M-CSF y su primer exón se logra corregir la osteopetrosis, daño neurológico, disminución del peso, defectos en la dentición y en la reproducción (Ryan *et al*, 2001).

El M-CSF humano es un potente quimioatrayente para células 32D con c-fms, lo que sugiere que el M-CSF sirve para reclutar monocitos de la circulación a sitios lesionados o inflamados (Pierce *et al*, 1990). Las células 32D no expresan el c-fms en forma constitutiva, por lo que la sola presencia de M-CSF no puede inducir su diferenciación a monocitos (Soddu *et al*, 1996., Sweet & Hume, 2003).

In vitro, el M-CSF es conocido por estimular la respuesta inflamatoria, mientras que *in vivo* es capaz de estimular a leucocitos PMN residentes para producir IL-6 y TNF α (Chapoval *et al*, 1998).

3. FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS-MACRÓFAGOS

3.1 Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos

El factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) o factor estimulador de colonias 2 (CSF-2) es una glucoproteína monomérica de 14-35 KDa que induce la proliferación y diferenciación de células progenitoras de la médula ósea del linaje granulocito-macrófago y está involucrado en la respuesta fisiológica durante infecciones y procesos inflamatorios. Es producido por células T (Th1 y Th2), linfocitos B de la zona del manto, macrófagos, células cebadas, células endoteliales, células epiteliales, neutrófilos y fibroblastos en respuesta a diferentes estímulos activadores de la respuesta inmune (Liu & Grundström, 2002).

3.2 Regulación génica

En el humano y ratón el gen para GM-CSF se localiza río abajo del gen para IL-3, separados sólo por 10 Kb en un locus que incluye los dos genes y numerosos elementos reguladores, todos dentro de una región de 30 Kb. El gen del GM-CSF humano se localiza en el cromosoma 5q31.1 y es procesado para originar un mRNA de 3175 pb formado por 4 exones. En ratón, el gen se localiza en el cromosoma 11 en un locus que forma parte de un cluster de citocinas que incluye a los genes para IL-4, IL-5 e IL-13. (Cockerill *et al*, 1999).

La región 5' del gen de GM-CSF contiene varios elementos reguladores conocidos como elementos conservados de linfocina (CLE). El elemento 0 (CLE0) se localiza 40 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y contiene sitios de unión para los factores de transcripción Ets y AP-1. Cercano a este elemento se encuentra el sitio de unión para Runx1c (también llamado AML1) y un poco más

alejado están los sitios para Sp1 y el factor nucleolar NF κ B, situado a 70 y 90 pb del sitio de inicio (Liu & Grundström, 2002).

Se sabe que la expresión de GM-CSF es tejido específica y puede ser inducida en respuesta a agentes proinflamatorios como LPS, IL-1, IL-2, INF γ , TNF α y TNF β ; siendo esta expresión dependiente de calcio (Cockerill *et al*, 1999). En linfocitos T, se sabe que la transcripción de GM-CSF es estimulada por efecto de Ca²⁺/calmodulina dependiente de calcineurina fosfatasa, aunque esta transcripción puede ser bloqueada por Ca²⁺/calmodulina dependiente de cinasa II, por la fosforilación de serinas en los sitios de unión de Ets, inhibiendo así la transcripción (Liu & Grundström, 2002).

La expresión del GM-CSFR en el humano es regulada negativamente por GM-CSF, TNF α y moléculas que activan a proteína cinasa C (PKC) en neutrófilos, monocitos y progenitores mieloides (Cannistra *et al*, 1990).

3.3 Receptor al factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos

El receptor para GM-CSF es expresado específicamente en neutrófilos, eosinófilos y en leucocitos polimorfonucleares (presentándose como un receptor de alta afinidad $K_d=199$ pM, con 100-1000 copias/célula). También este receptor ha sido identificado en mieloblastos de pacientes humanos con leucemia mielomonocítica (Xiao-Hong *et al*, 1994).

El GM-CSFR es un receptor heterodimérico que se compone de una cadena alfa específica de la citocina (GM-CSFR α de 45 KDa) que se une a su ligando con baja afinidad ($K_d=3-7$ nM) y una cadena común beta (GM-CSFR β de 120 KDa) que es la transductora de la señal, siendo compartida con los receptores a IL-3 e IL-5 y se asocia con la subunidad α , para formar un receptor de alta afinidad ($K_d=20-40$ pM). GM-CSFR α también puede estar presente en células no hematopoyéticas como células de la placenta y melanoma, mientras que la

presencia de GM-CSFR β se encuentra restringido a células mieloides (Xiao-Hong *et al*, 1994).

El gen del GM-CSFR α de humano se localiza en la región pseudoautosómica (PAR) en el extremo del brazo corto de los cromosomas Xp22.32 y Yp11.35, en una región que abarca 45 Kb y en ratón en el autosoma 19. El promotor para GM-CSFR α se encuentra 195 pb arriba del sitio de inicio de la transcripción. Al igual que otros genes que son regulados durante la diferenciación mieloides, no contiene la caja TATA en la región 5'. Posee regiones ricas en purinas que le permiten la unión a PU.1 en la parte 5' del gen. El factor PU.1 también posee la misma cercanía con el sitio de inicio de la transcripción del c-fms (Hohaus, *et al* 1995).

Río arriba de los sitios de unión para PU.1, existen secuencias con sitios de unión para proteínas de unión a CCAAT, como las proteínas de unión al potenciador C/EBP α , C/EBP β y C/EBP δ quienes se encargan de regular la expresión de genes del linaje mieloides durante la diferenciación mielomonocítica (Hohaus, *et al* 1995).

3.4 Ruta de señalización

El GM-CSR no tiene dominio de tirosina cinasa por lo que recluta proteínas cinasas relacionadas con Src, como la proteína JAK2 (Janus cinasas), que tiene 7 regiones de homología, llamados dominios JH (homólogos a Janus), que comparten las características de otros dominios de tirosinas cinasas. Esta proteína posee un dominio de pseudocinasa llamado JH2, que es esencial para la actividad de fosfotransferasa y es capaz de acoplarse a STAT; aunque la secuencia amino terminal de JAK2 es quién confiere la unión a la cadena β del receptor (Ortmann *et al*, 2000).

La molécula adaptadora de transducción de señales (STAM) es fosforilada en respuesta a GM-CSF y de esta forma STAM se asocia a JAK para formar un complejo con el receptor. Una vez que las JAK fosforilan a las isoformas STAT1, STAT3 y STAT5. Estos factores se heterodimerizan u homodimerizan vía interacciones SH2 y se translocan al núcleo para regular la transcripción de genes (Soldi *et al*, 1997).

3.5 Función biológica del GM-CSF

El GM-CSF estimula el desarrollo *in vitro* y la diferenciación de colonias de células progenitoras del linaje granulocito-macrófago, aunque también potencia la fagocitosis de neutrófilos y monocitos maduros (Metcalf *et al*, 1986). En leucocitos polimorfonucleares (PMN) y eosinófilos humanos aumenta el metabolismo oxidativo y aumenta la sobrevivencia celular (Begley *et al*, 1986).

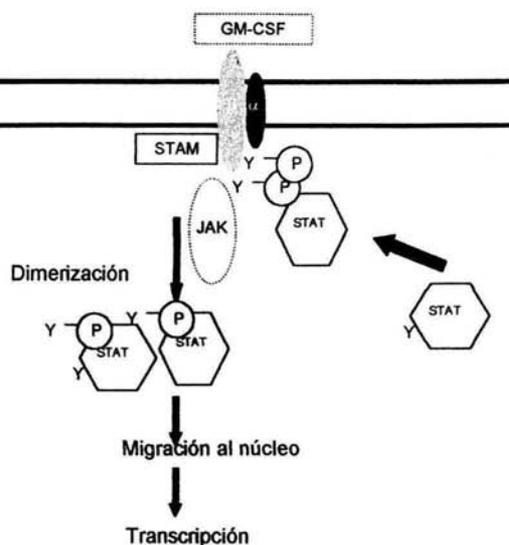


Figura 3. Modelo de la transducción de señales del GM-CSF (Tomado y modificado de Ortmann *et al*, 2000). Las subunidades del receptor activan Jaks, quienes se autofosforilan y fosforilan residuos de tirosina del receptor, de este modo los STAT forman dímeros y migran al núcleo.

El GM-CSF *in vivo* interviene en el reclutamiento y activación de células mieloides a sitios de inflamación; estimula la actividad antimicrobiana de monocitos y linfocitos, lo que resulta de interés para el tratamiento de enfermedades infecciosas en pacientes con SIDA (Blanchard *et al*, 1991). Por otro lado, también se postula su uso como molécula diferenciadora en pacientes con inmunodeficiencias que desarrollan neutropenia (Hewit *et al*, 1993).

Con respecto a la liberación de citocinas, el GM-CSF aumenta la producción de IL-1 e indirectamente puede estimular la liberación de IL-2 en células procesadoras de antígenos. Además, junto con IL-3 puede activar la citotoxicidad de monocitos humanos, por inducción de $TNF\alpha$ (Morrisey *et al*, 1987). Ratones transgénicos que expresan constitutivamente este gen muestran una aumentada motilidad de macrófagos, lesiones inflamatorias en ojos y músculo acompañados de grandes acumulaciones de macrófagos en la cavidad pleural y peritoneal, lo que debe de involucrar una regulación del gen a nivel transcripcional, ya que su presencia es observada en distintos tejidos (Nichilo & Burns, 1992).

La interrupción en la expresión del gen GM-CSF tiene un efecto relativamente bajo en el linaje macrófágico, con la excepción de defectos funcionales en macrófagos alveolares, por lo que su expresión no es esencial en el desarrollo de poblaciones de macrófagos independientes de M-CSF (Guidez *et al*, 1998).

4. RECEPTORES Fc GAMMA

4.1 Diversidad estructural de receptores FcRs

A las diferentes clases de receptores que tienen la capacidad de interactuar con el dominio Fc de inmunoglobulinas circulantes o con complejos antígeno-anticuerpo se les conoce como FcRs. Se considera que existen receptores específicos para cada clase de cadena pesada y su función fisiológica varía entre los diferentes tipos celulares (Hogart, 2002).

El grupo de FcRs incluye el receptor de alta afinidad a IgE, el $Fc\epsilon R$ y los receptores de alta y baja afinidad para IgG conocidos como receptores Fc gamma ($Fc\gamma R$) (Beigier *et al*, 2003., Ravetch, 1994). Existen tres tipos de $Fc\gamma R$, cuya distribución tisular y actividad biológica es característica y su expresión se considera una propiedad que es adquirida por células mieloides durante el proceso de diferenciación (Calcagno *et al*, 1982).

4.2 Estructura

Los receptores Fc γ Rs son glucoproteínas de membrana compuestas de una subunidad α de unión al ligando que consiste de un dominio de Ig de la clase C2 (Ravetch & Clynes, 1998). Asociada a la subunidad α se pueden encontrar a las subunidades accesorias de señalización: las cadenas CD3 γ , ζ (o ambas). La cadena γ es una proteína de 7 KDa (Melendez *et al*, 1998), originalmente identificada como un componente del Fc ϵ RI de mastocitos, mientras que la cadena ζ forma parte del complejo antígeno receptor de las células T y B (TCR y BCR) (Hogart, 2002).

En general los Fc γ Rs interactúan con todas las subclases de IgG que por su peso molecular, afinidad y especificidad por ligando, se clasifican en tres grupos: el receptor de alta afinidad Fc γ RI (CD64), con una constante de asociación $K_a=10^7-10^8M^{-1}$, capaz de unirse a un monómero de IgG por poseer un tercer dominio extracelular en la subunidad α , los receptores de baja afinidad Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16) con una $K_a=<10^7M^{-1}$, estos últimos receptores fijan preferentemente complejos de IgG (Dijstelbloem *et al*, 2002).

Fc γ RI y Fc γ RIIIa son receptores activadores que en su dominio citoplasmático no presentan un motivo activador de tirosina del inmunoreceptor (ITAM), por lo que se asocian con las cadenas γ , ζ y β para desencadenar la activación celular. Fc γ RIIb es un receptor inhibitorio que contiene un motivo inhibitorio de tirosina del inmunoreceptor (ITIM), mientras que Fc γ RIIa presenta ITAM (Billadeau & Leibson, 2002). La excepción es Fc γ RIIIb quién se une al sitio externo de la membrana plasmática a través de moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Qin *et al*, 2000).

4.3 Receptor de alta afinidad Fc γ RI (CD64)

El receptor Fc γ RI de humano es una glucoproteína de membrana de 72 KDa en humano y 70 KDa en ratón. Se expresa constitutivamente en monocitos,

macrófagos y células dendríticas. Aunque su inducción también puede presentarse en neutrófilos y eosinófilos (Uciechowsky *et al*, 1998).

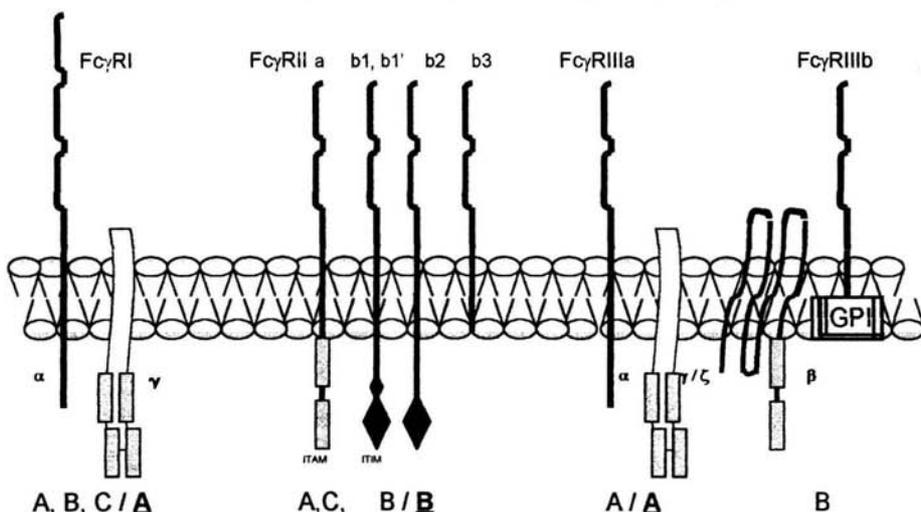


Figura 4. Estructura de los receptores *Fcγ* de humano y ratón. Todas son moléculas transmembranales, con la excepción de hFcγRIIIb que se encuentra anclado a la membrana a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI), las subunidades individuales se muestran en letras griegas. Se muestran los dominios extracelulares. Los motivos de activación de tirosina del receptor (ITAM) son de dominio citoplasmático y se indican por cilindros, mientras que el motivo inhibitor (ITIM) se observa en el rombo. Los genes que codifican para los receptores de ratón están subrayados (Tomado y modificado de Kazatchkine & Kaveri, 2001).

Los tres genes A, B y C descritos para este receptor están formados por 6 exones, que se localizan en el cromosoma 1q21.1 humano. El gen A codifica para una proteína transmembranal. Un transcrito del gen B codifica para otra forma transmembranal con dos dominios en la región extracelular, mientras que un segundo transcrito de B y C codifican para receptores solubles. En ratón sólo existe el gen A, el cuál se localiza en el cromosoma 3 (Flores *et al*, 1998).

El FcγRI contiene tres dominios extracelulares para IgG. El primer dominio es responsable de la estabilización estructural y el segundo dominio de unión al ligando. El dominio 3 le confiere la alta afinidad, lo que le permite interactuar con todas las subclases de IgG (Dahlström, 2001).

Se conoce que el Fc γ RI participa de forma importante en la fagocitosis y en la unión de complejos inmunes, además interviene en la generación de ácido araquidónico, en la secreción de quimosinas y citocinas que intervienen en la degranulación celular potenciando la respuesta inmune (Tkaczyk *et al*, 2002., Beigier *et al*, 2003).

En células mieloides el INF γ induce la expresión del gen Fc γ RI vía PU.1 que interactúa con la maquinaria de la transcripción y STAT que permite la activación del promotor mediante la proteína de unión a CREB (CBP) (Aittomäki, *et al*, 2002). También se sabe que el TNF α y el LPS inducen un incremento en la expresión de Fc γ RI humano. Mientras que en ratón el INF γ y la IL-1 inducen la expresión de este gen en células mieloides (Hulett & Hogart, 1994., Fernández *et al*, 2002a., Córdova, 2003).

4.4 Receptor de baja afinidad Fc γ RII (CD32)

El Fc γ RII de humano se encuentra ampliamente distribuido en diferentes tipos celulares y a excepción de las células NK, se expresa prácticamente en todos los leucocitos. También se expresa en otros tipos celulares como células del trofoblasto, células endoteliales del villi de la placenta y células de Lagerhans (Flores *et al*, 1998). La expresión de Fc γ RIIB de ratón se expresa preferentemente en linfocitos B, células dendríticas, monocitos y macrófagos, mientras que las isoformas de los genes Fc γ RIIA y Fc γ RIIC se expresan en neutrófilos (Dijstelbloem *et al*, 2002).

El Fc γ RII es una glucoproteína de 40 kDa, que se presenta en 6 isoformas, siendo todas transmembranales, con excepción de un receptor soluble. Tres genes diferentes codifican las variantes humanas (A, B o C) de Fc γ RII que están constituidos por ocho exones que se encuentran localizados en el cromosoma 1.q23-24, separados de los genes del receptor Fc γ RIII por 200 Kb, mientras que en el ratón sólo se ha identificado un gen, localizado en el cromosoma 1 (Fernández *et al*, 2002b).

La región citoplasmática del receptor II está codificada por tres exones, mientras que la de los receptores I y III sólo tienen un exón que codifica para la región citoplasmática. Aunque sus 2 dominios extracelulares y el transmembranal se encuentran altamente conservados, la región citoplasmática posee gran heterogeneidad, lo que sugiere que cada isoforma puede enviar diferentes señales al interior de la célula (Dahlström, 2001).

En ratón sólo el inhibitorio FcγRIIB es expresado. De un simple gen que codifica para FcγRIIB se forman 4 variantes diferentes, quienes difieren sólo en su cola citoplasmática. Las isoformas B1 y B1' difieren en que B1' presenta un inserto de 19 aminoácidos en la región 5' del exón. La isoforma B2 a diferencia de B1 carece de un fragmento de 47 aminoácidos y B3 es una variante soluble de B2 expresado en macrófagos que carece de las secuencias que codifican para las regiones intracitoplasmática y transmembranal (Williams *et al*, 2000).

La activación de FcγRIIb desencadena apoptosis en células B y eosinófilos, además de afectar la proliferación de células B, sus vías de señalización intracelular que activan la respuesta inmune, la secreción de IgG y la presentación de antígenos (Dahlström, 2001).

FcγRIIb es necesario para la regulación de la liberación de calcio inducida por el receptor de células B y la proliferación celular, por lo que FcγRIIb es capaz de inhibir la proliferación de los linfocitos B. Esta característica de FcγRIIb contribuye al mantenimiento de la tolerancia periférica durante la maduración de células B, al provocar la delección de linfocitos de baja afinidad. La inactivación de FcγRIIb genera una intensa respuesta inmune (Fernández, 2002a).

También se sabe que FcγRIIb participa en la acreditación de ICs en la sangre, evento que se lleva a cabo con la unión de ICs al receptor del complemento (CR1) en eritrocitos y posteriormente son transferidos a fagocitos, gracias a la acción de FcγRIIb (Dijstelbloem *et al*, 2002). FcγRIIb es considerado

como un receptor no inflamatorio, cuya delección provoca una aumentada susceptibilidad a enfermedades inducidas por ICs. Polimorfismos en las regiones reguladoras del gen *FcγRIIB* afectan su expresión y función del receptor, ya sea en el desarrollo de auto-anticuerpos y acreditación de ICs, siendo esto manifestado en diferentes patologías autoinmunes (Wernersson *et al*, 1999., Jiang *et al*, 2000).

Se sabe que el $\text{INF}\gamma$ induce la expresión de *FcγRII* en células endoteliales de la aorta humana (Pan, *et al* 1998), mientras que la *IL-4* participa como inhibidor de *FcγRIIA*, aunque puede provocar un aumento de *FcγRIIB2* en monocitos. Mientras que en ratón la *IL-1* e $\text{INF}\gamma$ inducen la expresión de este receptor (Hulett & Hogart, 1994., Lucas *et al*, 1998., Córdova, 2003).

4.5 Receptor de baja afinidad *FcγRIII* (CD16)

El *FcγRIII* murino es expresado en macrófagos, células cebadas y posiblemente en células dendríticas. Este es el único *FcγR* expresado en células NK murinas y de humano. Su peso molecular es heterogéneo, ya que se han reportado formas desde 50 hasta 60 kDa, lo que podrá explicarse por diferentes grados de glucosilación. Mientras que el receptor de humano pesa 72 kDa y es el receptor *Fc* predominante en la sangre (Flores *et al*, 1998). En ratón, sólo una forma de *FcγRIII* es expresada mientras que en humanos hay dos, *FcγRIIIA* y *FcγRIIIB*, que se localizan en cromosoma 1.q23-24. Los genes para *FcγRIIIA* y *FcγRIIIB* están constituidos por 5 exones, los transcritos de ambos genes difieren solamente en 10 nucleótidos y ambos codifican para receptores con una región extracelular dividida en 2 dominios tipo Ig, un dominio transmembranal de 21 aminoácidos y una región citoplasmática de 25 aminoácidos (isoforma a) o de 4 aminoácidos (isoforma b), esta diferencia se debe al cambio de fenilalanina en la posición 203, propia de una molécula transmembranal, mientras que la isoforma b tiene una serina que provoca que el receptor se asocie a la membrana a través de una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI), haciendo de este un receptor no transmembranal (Dahlström, 2001., Dijkstra *et al*, 2002).

Los dos genes de este receptor se expresan de manera específica en determinados tipos celulares: el Fc γ RIIIA se expresa en macrófagos y células NK donde interactúa con IgG monomérica y agregada, mientras que Fc γ RIIIB se expresa selectivamente en granulocitos y presenta baja afinidad por IgG monomérica (Flores *et al*, 1998).

Para ser funcionalmente activos, Fc γ RIII tiene que asociarse con la cadena γ , siendo esto necesario para una correcta internalización de ICs. En células cebadas de ratón el Fc γ RIII se asocia con la cadena γ y β , donde la cadena β actúa como un amplificador de la respuesta de Fc γ RIII mediada por la cadena γ (Figura 6) (Dahlström, 2001).

La internalización de ICs por la activación de Fc γ Rs puede influenciar a los epítopes que son presentados por APCs, ya que ciertos epítopes son presentados selectivamente después de su internalización por Fc γ RIII, especialmente en células T donde se presentan epítopes crípticos (Dahlström, 2001).

El Fc γ RIIIA de humanos es inducido por TGF β , mientras que INF γ , GM-CSF y G-MCSF estimulan la expresión de Fc γ RIIIB. En ratón el GM-CSF, INF γ , IL-1 induce la expresión de Fc γ RIII, mientras que IL-4 reprime la expresión de este gen (Hulett & Hogart, 1994., Córdova, 2003).

4.6 Ruta de Señalización

Los Fc γ Rs son activados al interactuar con ICs, desencadenando una serie de señalizaciones intracelulares que también son compartidas con los receptores de células B (BCR) y T (TCR) (Billadeau & Leibson, 2002). Cuando se logra un entrecruzamiento con el dominio extracelular del receptor hay una activación de fosfotirosinas cinasas (PTKs) de la familia Src localizadas en los motivos de activación del receptor al antígeno (ARAMs). Esta asociación se lleva a cabo mediante la secuencia consenso YXXL/I (X6-8) YXXL/I del ITAM (Kim *et al*, 2002).

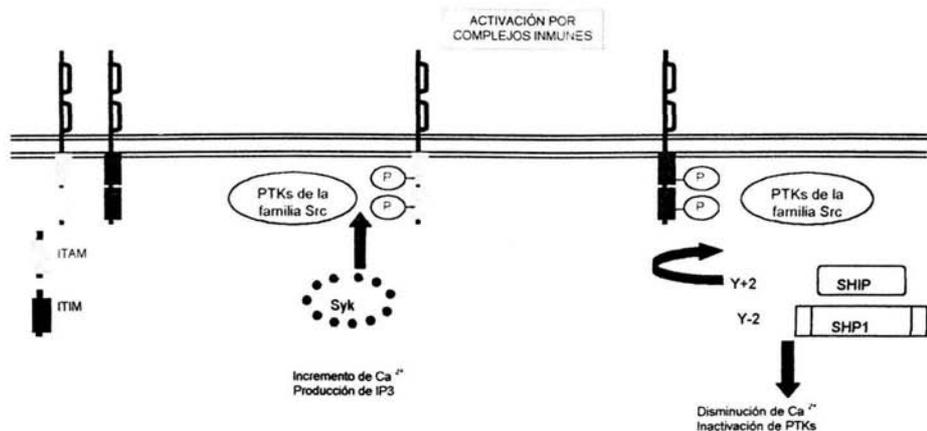


Figura 5. Modelo de las transducción de señales desencadenadas por los ITAMs e ITIMs en los receptores FcγR (Tomado y modificado de Billadeau & Leibson, 2002). En las señales de activación las PTKs se encargan de fosforilar residuos de tirosina, para permitir la interacción de tirosinas cinasas como Syk lo que permitirá la producción de IP3 y calcio, mientras que en las señales de inhibición las fosfatasa SHIP o SHP1 interrumpirán estas señales de activación.

La fosforilación del receptor permite la interacción de este, con otra clase de tirosinas cinasas como Hck, Lyn, Fgr, Syk y ZAP-70 a través de interacciones en los sitios SH2 del ARAM, lo que culminará con la fosforilación de múltiples moléculas de señalización involucradas en la activación del receptor como Rac, Rho y Rab (Chuang *et al*, 2000., Kim *et al*, 2002).

Durante las señales de activación ocurre la fosforilación de proteínas, el incremento del calcio intracelular, producción IP3 (1, 4, 5 trifosfato de inositol) y DAG (diacilglicerol) principalmente a través de la familia de Src cinasas, PI3K y fosfolipasa C (PLC) (Melendez *et al*, 1998). Las señales de activación que son iniciadas por receptores que contienen ITAMs asociados a la cadena y pueden ser atenuadas por receptores que contienen ITIM. En contraste, cuando se activan secuencias de ITIM, las proteínas PTKs se encargan de fosforilar el residuo de tirosina de la secuencia citoplasmática (I7V7L/S)-X-Y-X-X-(L7V). Lo que desencadena la activación de la fosfatasa de inositol SHIP o la fosfatasa de tirosina (SHP1) (Okada *et al*, 1998). Una leucina en la posición (Y+2) favorece la

unión a SHIP, mientras que una isoleucina en la posición (Y-2) favorece la unión a SHP1 (Billadeau & Leibson, 2002).

SHIP puede hidrolizar a PIP3 de la membrana, liberando moléculas como tirosinas cinasas de Bruton (Btk) y PLC γ 1. Por lo tanto la señalización de calcio es suprimida debido a la disminución del calcio extracelular. Mientras que, SHP1 remueve directamente grupos fosfatos de proteínas, revertiendo los efectos principales que siguen a la activación de PTKs (Rudge, 2000., Okada *et al*, 1998).

5. CASEÍNAS

5.1 Contenido proteico de la leche

La leche es un complejo nutricional que contiene más de cien sustancias disueltas en agua. La caseína, la principal proteína presente en la leche se encuentra dispersa en un gran número de partículas en suspensión coloidal que se conocen como miscelas (Wattiaux, 2002). Las proteínas de la leche son agrupadas en el grupo de las caseínas y proteínas del suero ya que son estas fracciones las que resultan, después de haber sido sometidas a la acción proteolítica de la renina (Wattiaux, 2002., Gerritsen, 2001). La concentración de proteína en la leche bovina varía de un 3.0-4.0%, el cuál está compuesto entre un 76-86% por caseínas (30-35g/L) (Sorensen & O'donell, 2003., Brophy *et al*, 2003).

5.2 Miscelas de caseínas

La fracción de caseína de la leche bovina comprende cuatro proteínas α_{s1} -, α_{s2} - (que son altamente fosforiladas), β - (más hidrofóbica) y κ -caseína (glicosilada) las cuales existen en una proporción aproximada de 39, 10, 37 y 14% (Marchesseau, 2002., Sorensen & O'donell, 2003). La κ -caseína se encuentra en la superficie de la miscela, mientras que el interior de la miscela está compuesto por las fracciones α s (α_{s1} - y α_{s2} - en una proporción 4:1) que están altamente fosforiladas y la β -caseína que se une a moléculas de fosfato de calcio, contribuyendo a los altos niveles de calcio que se encuentra en la leche (Brophy *et al*, 2003., Dalgleish, 1998).

Las mezclas de caseínas no sólo incorporan sales de calcio, si no que también presentan gran afinidad por cationes divalentes y trivalentes como el hierro o el zinc, debido a sus residuos de serinas que se encuentran fosforilados en las secuencias –SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-. Los péptidos que presentan estas secuencias son conocidos como caseinofosfopéptidos (CPP) (Marchesseau *et al*, 2002., Díaz *et al*, 2003).

5.3 Estructura de las caseínas

La heterogeneidad que existe en las caseínas surge de su procesamiento postraducciona, ya que sufren fosforilación, glucosilación (sólo para κ -caseína) o son sometidas a la acción proteolítica de plasmina en el caso de la β -caseína. Todas las caseínas son fosfoproteínas de bajo peso molecular (19-25 KDa) y son fuertemente hidrofóbicas en el rango de $\beta \rightarrow \kappa \rightarrow \alpha_{s1} \rightarrow \alpha_{s2}$. (Dalgleish, 1998). La diferencia que hay entre los grados de asociación de las caseínas en las mezclas se debe a la separación que hay entre sus clusters hidrofóbicos y a las regiones cargadas negativamente a lo largo de la cadena peptídica (Di Paola *et al*, 2000).

Las caseínas en sí mismas no poseen una estructura terciaria definida. Sus partes hidrofóbicas pueden entrar en contacto con el agua sin que la proteína rápidamente se pliegue para evitar esta intrusión. Las caseínas, también pueden soportar el calor ya que no sufren alteraciones estructurales (Gerritsen, 2001).

La κ -caseína difiere de otras caseínas por que posee mayor solubilidad en concentraciones más altas del ion calcio. Parece ser que κ -caseína es la clave para la estructura de la mezcla, ya que estabiliza a α_{s1} - y β - caseína, quienes son insolubles en calcio (Kumonsinski *et al*, 1991).

5.4 Actividades biológicas

Cuando las caseínas son sometidas a proteólisis enzimática y bacteriana, se liberan péptidos bioactivos de cerca de diez aminoácidos, que se conocen como exorfinas o casoxinas (α -caseína), casomorfinas (β -caseína) y casoxinas (κ -

caseína) (Teschemacher *et al*, 1997). Estos péptidos estimulan el sistema inmune de recién nacidos y una mayor resistencia a infecciones vírales y bacterianas en adultos por estimular la producción de fagocitos (Fiat *et al*, 1993).

Las β -casomorfina actúan sobre la conducta, proliferación de linfocitos de sangre periférica y en los mecanismos de liberación de histamina por leucocitos (Teschemacher *et al*, 1997). Por otra parte, péptidos derivados de la β -caseína mostraron actividad moduladora en la función de macrófagos (Sandré *et al*, 2001).

La β -caseína muestra actividad inmunomoduladora, ya que aumenta la producción de anión superóxido por neutrófilos y la proliferación de linfocitos (Wong *et al*, 1996); mientras que la κ -caseína es capaz de actuar en la melanogénesis, ya que tiene un efecto despigmentador, se sabe que el extremo carboxilo del glicopéptido es quién promueve la proliferación celular e inhibe la actividad de tirosina cinasas en células B16 (Nakajima *et al*, 1996).

En células de la mucosa intestinal de ratón, la α -caseína y su sal, el caseinato de sodio induce la liberación de colescitolina, hormona involucrada en la digestión e incrementan las concentraciones de calcio intracelular (Ferratetto *et al*, 2001., Hira *et al*, 2003). El hidrolizado de caseína bovina suprime la proliferación de linfocitos *in vitro* (Pessi, *et al* 2001). Por otra parte, existen datos que indican que las caseínas poseen con actividad antihipertensiva (Mulvihill & Fox, 1979) y antibiótica (Lahov & Rehelson, 1996).

5.5 Caseínas y hematopoyesis

En el campo de la hematopoyesis se ha observado que la eliminación de la caseína en la dieta de ratones, provoca una reducción en la generación de leucocitos y una dieta complementada con caseína reduce la mielosupresión (Aschkenasy, 1968). La caseína, también puede activar la eritropoyesis en ratones, ya que induce la producción de EPO (Okano *et al*, 1992).

Cuando se disuelve caseína en hidróxido de sodio, se obtiene el caseinato de sodio (CasNa), una sal compuesta en un 65% de proteínas (Walstra & Jenners 1984). El CasNa cuando es inyectado vía intraperitoneal en ratones, induce una respuesta inflamatoria, promoviendo inicialmente la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal (Pasotti *et al*, 1993) y un incremento en la concentración G-CSF y GM-CSF en esta cavidad (Metcalf, *et al* 1996). El CasNa también induce cambios morfológicos y funcionales en cultivo de macrófagos de la microglia residentes hacia macrófagos activados (Yao *et al*, 1990).

Además, 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 solo induce la producción de M-CSF en los granulocitos (Santiago, *et al* 1994), mientras que en células en banda de médula ósea se acelera su diferenciación a neutrófilos segmentados en presencia de CasNa (Bautista, 1998).

Se sabe que el CasNa al adicionarse al cultivo de células 32D, una línea mielóide multipotencial de ratón dependiente de IL-3 y ampliamente usada en el estudio de la hematopoyesis normal reduce la multiplicación celular en forma dosis dependiente a pesar de la presencia de IL-3 e induce diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago así como la expresión de receptores Fc y producción de radicales libres (Ramos *et al*, 2000).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se demostró que el CasNa inhibe la proliferación e induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de las células 32D, una línea mielóide multipotencial de ratón dependiente de IL-3, mientras que en la línea leucémica mielomonocítica de ratón WEHI3 también reduce la proliferación.

No se conoce si esta modulación en la proliferación y diferenciación es mediada por la inducción de la expresión de citocinas del linaje monocito-macrófago, por lo que en este trabajo se determinó el papel de la α -, β - y κ -caseína (principales componentes del CasNa) como moléculas que modulan la expresión de genes del linaje monocito-macrófago (M-CSF, GM-CSF y sus receptores) en un modelo de la hematopoyesis normal y leucémica.

Finalmente, para contar con un parámetro de diferenciación funcional, también se estableció el efecto de estas moléculas en la expresión del mRNA para los receptores Fc γ R, una propiedad adquirida por células mieloides durante su diferenciación, ya que el CasNa induce formación de rosetas, un índice para evaluar la presencia de estos receptores en la línea 32D (Ramos *et al*, 2002).

VI. JUSTIFICACIÓN

Anormalidades en el proceso de formación de células sanguíneas, conocidas como leucemias ocupan el séptimo lugar como causa de muerte en la población de todas las edades en la República Mexicana (Benítez, 2002). No obstante, en la Ciudad de México la leucemia representa la segunda causa de muerte en menores de 15 años con un 8.3% y en la población productiva (15-64 años) presenta 1% de mortalidad (Sistema Nacional de Información en Salud, 2001), por lo anterior, resulta de interés el estudio de los mecanismos que intervienen en la regulación de la hematopoyesis normal y leucémica. De comprobarse que las caseínas, aunque de naturaleza distinta a las citocinas también modulan este proceso, estos estudios ampliarían el conocimiento básico sobre el control de la hematopoyesis normal y leucémica y podrían ser de utilidad para el planteamiento de nuevas opciones terapéuticas.

VII. HIPÓTESIS

El CasNa, que está constituido por α -, β - y κ -caseína, induce diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago en la línea celular hematopoyética 32D. En la hematopoyesis, las citocinas responsables de la diferenciación macrofágica son M-CSF y GM-CSF vía la interacción con sus receptores; por lo anterior, se espera que la α -, β - y κ -caseína sean capaces de modular la expresión del mRNA de estos genes. Además, se sabe que el CasNa induce la formación de rosetas en la línea 32D, por lo que también es posible que las caseínas induzcan la expresión del mRNA de los receptores Fc γ R.

Por otra parte, el CasNa y las caseínas inhiben la proliferación de la línea leucémica WEHI3, por lo que también se espera que estas moléculas induzcan la expresión de genes del linaje monocito-macrófago.

VIII. OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL**

Establecer si el CasNa, α -, β - y κ -caseína modulan la expresión de los genes del linaje monocito-macrófago (M-CSF, GM-CSF y los receptores c-fms, GM-CSFR α y Fc γ Rs) en la línea normal hematopoyética multipotencial 32D y la línea leucémica mielomonocítica WEHI3 de ratón.

- **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar si el CasNa, α -, β - y κ -caseína inducen la transcripción del gen M-CSF y de su receptor c-fms en las líneas celulares 32D y WEHI3.

2. Determinar si el CasNa, α -, β - y κ -caseína inducen la transcripción del gen GM-CSF y de su receptor GM-CSFR α en las líneas celulares 32D y WEHI3.

3. Determinar si el CasNa, α -, β - y κ -caseína inducen la transcripción de los genes de los receptores Fc gamma (Fc γ Rs) tipo I, II y III en las líneas celulares 32D y WEHI3.

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

- **Condiciones de Cultivo**

La línea mielóide multipotencial 32D dependiente de IL-3 fue donada por la Dra. T. Hoang del laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia en Montreal, Québec, Canadá. La atmósfera de cultivo es 5% de CO₂ en medio Iscove's modified Dulbecco's (Gibco BRL USA), suplementado con 10% de suero fetal de bovino previamente desactivado a 56° C (Gibco BRL USA), 0.5ng/ml de rmlL-3 (R & D System USA), 25 µl/ml de ciproxina 0.2% y se incubó a 37° C en cajas Petri Fisher (Fisherbrand Scientific, Pennsylvania).

La línea leucémica WEHI3 obtenida del ATCC (American Type Culture Collection) se mantuvo en una atmósfera de cultivo de 5% de CO₂ en medio Iscove's modificado por Dulbecco's (Gibco BRL USA), suplementado con 10% de suero fetal de bovino, 0.1ng/ml de β- mercaptoetanol (Gibco BRL USA), 2.5 µl/ml de ciproxina e incubado a 37° C en cajas Petri Fisherbrand.

- **Tratamiento de las células 32D y WEHI3 con caseinato de sodio, α-, β- y γ- caseína.**

El CasNa (Difco Laboratorios, Detroit, Michigan USA), α-, β- y γ- caseína (SIGMA Chemical St Louis MO USA) se solubilizaron en agua desionizada estéril y se esterilizaron por autoclave. Se prepararon a una concentración de 2 mg/ml (Ramos *et al*, 2000).

Las células 32D fueron cultivadas durante 24 horas a una densidad inicial de 3x10⁶ /ml y de 2x10⁶ /ml para WEHI3. En el inicio de cultivo se adicionaron el CasNa, las caseínas y como control del vehículo se utilizó agua desionizada estéril. Como control positivo para detectar FcγRs se utilizó INFγ (25ng/ml) (Ledesma, 2002).

Cuando el tratamiento fue de 6 horas, se cultivaron 6-8x10⁶ cel/ml en presencia y ausencia de los estímulos.

La duración del tratamiento para determinar el efecto en la expresión de los genes M-CSF, c-fms, GM-CSF y GM-CSFR α sus receptores fue de 24 horas. Para los receptores Fc γ R fue de 6 y 24 horas.

- **Cuantificación celular**

La cuantificación celular se lleva cabo, resuspendiendo los cultivos celulares y colocando alícuotas en un hemocitómetro bajo un microscopio óptico (Carl Zeiss).

Para determinar la existencia de muerte por necrosis se empleó el método de incorporación de azul tripano (SIGMA Chemical St Louis MO USA), mezclada en una proporción 1:1 y observada al microscopio en un hemocitómetro y se evaluó la diferencia entre las teñidas por el colorante (muertas) y no teñidas.

- **Extracción de RNA**

Las células obtenidas del cultivo celular fueron sometidas a *lisis celular*.

1. Se centrifugó el cultivo para obtener el botón celular a 500g durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante.
2. Se resuspendió el botón con 3 ml de PBS (solución buffer de fosfatos) y se centrifugó a 500g durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante. Se hizo un segundo lavado con 2 ml de PBS a la misma velocidad y duración. Se decantó el sobrenadante.
3. Con 1ml de PBS se resuspendió el botón y se transfirió todo el volumen a un tubo de microcentrífuga, para su posterior centrifugación durante 10 segundos. Con micropipetas se desechó el volumen sobrante de PBS.
4. Se agregó 1ml de Trizol (por 6×10^6 células) (Invitrogen life technologies CA, USA) y se resuspendió vigorosamente. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta la extracción del RNA.

Separación de RNA

1. La muestra descongelada se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para lograr la disociación de nucleoproteínas.
2. Se agregó 200 μ l de cloroformo (SIGMA) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

3. Se centrifugó a 12000 rpm a 4° C durante 15 minutos.

Precipitación

1. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrifuga estéril.

2. Para precipitar el RNA se agregó 800µl de alcohol isopropílico (Sigma), se agitó manualmente y con un agitador mecánico. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 10 minutos para obtener el botón de RNA.

Lavado

1. Se eliminó el sobrenadante. El botón se lavó con 1 ml de etanol puro y se agitó. Se centrifugó a 7500 rpm a 4° C durante 5 minutos.

2. Posteriormente se removió el sobrenadante y se dejó secar el botón a temperatura ambiente.

3. El botón de RNA se disolvió en agua con DEPC (Dietilpirocarbonato 0.01%) durante 10 minutos a 55° C y se almacenó a -70° C.

• **Cuantificación de RNA**

La cantidad de RNA fue determinada midiendo su absorbancia en una dilución 1:1000 de RNA con agua desionizada estéril en un espectrofotómetro (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey) a una longitud de onda de 260 nm y la pureza se determinó por la proporción de absorbancia a 260/280.

La integridad del RNA obtenido fue comprobada cualitativamente mediante el corrimiento de un gel de agarosa al 2% teñido con 4µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) a 70mV (distinguiéndose las bandas 18S y 28S ribosomales).

• **Preparación de cDNA**

Posteriormente el RNA mensajero fue retrotranscrito utilizando el kit de PERKIN ELMER GeneAmp ARN PCR N808-0017, New Jersey, USA). El RNA total (1µg) fue mezclado con 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de buffer de retrotranscripción 10x, 0.5 µl de agua DEPC (Dietilpirocarbonato), 4 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (DNTPS 10mM), 0.5 µl inhibidor de RNAsa (20 U/mL) y 0.5 µl de enzima retrotranscriptasa reversa de virus de leucemia de ratón

MuLV, 0.5 µl de oligo dT y 0.5 µl de ditioneitol (DTT). Las muestras fueron incubadas a 42° C durante una hora, seguido por un aumento de la temperatura a 90° C por 10 minutos en un termociclador (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey). El cDNA obtenido fue mantenido a -20° C hasta su uso.

- **PCR (Polimerase Chain Reaction)**

La mezcla de reacción consistió en 2 µl de MgCl₂, 4 µl de buffer de PCR 10x, 1 µl de desoxirribonucleótidos trifosfato (DNTPS), 28.35 µl de agua con DEPC y 0.25 µl de Taq (Polimerasa de *Termus aquaticus* 5 U/ml).

Se adicionó 0.2 µl de primer β-actina sentido (1µM) y 0.2 µl de primer β-actina antisentido.

A esta mezcla se le agrego el volumen de cDNA obtenido en la retrotranscripción. Se incubó la muestra por un minuto y cuarenta y cinco segundos a 95° C, ligado a 35 ciclos de dos segmentos con 15 segundos a 95° C y treinta segundos a 60° C. Posteriormente se incubó siete minutos a 72° C en el termociclador (Techne model FGEN05TP, techne, Inc; Princeton, NJ, USA).

Los productos de PCR fueron almacenados a -20° C.

La ausencia de contaminantes de la mezcla de RT-PCR fue revisada por muestras de controles negativos, es decir sin RNA.

β-actina (Raivich <i>et al.</i> , 1998)	Sentido	GGGTGAGAAGGATTCTATG	238 pb
	Antisentido	GGTCTCAAACATGATCTGGG	
M-CSF (Raivich <i>et al.</i> , 1998)	Sentido	TCGACATGGCTGGGCTCCC	527 pb
	Antisentido	ATCAGGCTTGGTCACCATC	
c-fms (Raivich <i>et al.</i> , 1998)	Sentido	TTGTACCGAGCTTGAAGACCC	552 pb
	Antisentido	AGCCTTGAGACTGAGAGCCC	
GM-CSF (Bost <i>et al.</i> , 2000)	Sentido	TTTACTTTTCTGGGCATTGTGGTC	340 pb
	Antisentido	CCGCATAGGTGGTAACTTGTGTTTC	

GM-CSFR α (DeKoter <i>et al.</i> , 1998)	Sentido	GAG GTC CAC AGG TCA AGG TG	598 pb
	Antisentido	GAT TGA CAG TGG CAG GCT TC	
Fc γ RI (Sandor <i>et al.</i> , 1994)	Sentido	TGCAGGAGTGTCATCACGGGGGGTGGGAAAGA	350 pb
	Antisentido	GGATGTGAAACCAAGACCAAGGAGGTGATGA	
Fc γ RII (Sandor <i>et al.</i> , 1994)	Sentido	GCTGGAGGAACAACTACTGAACAG	B1 477 pb
	Antisentido	GCAGTTCCTCCAGATCAGGAGGA	B2 339 pb
Fc γ RIII (Sandor <i>et al.</i> , 1994)	Sentido	CACTTGTTCTTTGAGGAGCCTGGTGCT	256 pb
	Antisentido	AGTCACAGTGGGGACTACTACTGCA	

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos. Todos los oligonucleótidos tuvieron una Tm de 60° C.

- **Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa a una concentración del 2% diluidos en TBE 1X (Tris, Boric acid and EDTA) y teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml).

Se emplearon marcadores de peso molecular de 147, 160, 180, 190, 201, 217, 242, 307, 404, 527 y 622 pb (Biotecnologías universitarias, México).

Los geles se corrieron a un voltaje de 70 V y se visualizaron las bandas en un transiluminador de UV. Las fotografías fueron tomadas con cámara CCD Foto/Analyst (Fotodyne, Hartland USA).

Todos los ensayos fueron realizados cuando menos tres veces de forma independiente. Los resultados de proliferación y viabilidad celular fueron sometidos a una prueba de T para diferencia de medias con una $P < 0.05$ respecto al basal.

X. RESULTADOS

Las caseínas inhiben la proliferación de la línea celular mieloide multipotencial 32D y de la línea leucémica mielomonocítica WEHI3.

Recientemente se demostró que el CasNa inhibe la proliferación de la línea normal mieloide 32D y de la línea leucémica mielomonocítica WEHI3 a las 96 horas de cultivo. Además, el CasNa induce diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago en la línea 32D (Ramos *et al*, 2000). Datos adicionales en este laboratorio también indican que las caseínas, moléculas que componen el CasNa también muestran un efecto modulador en la hematopoyesis.

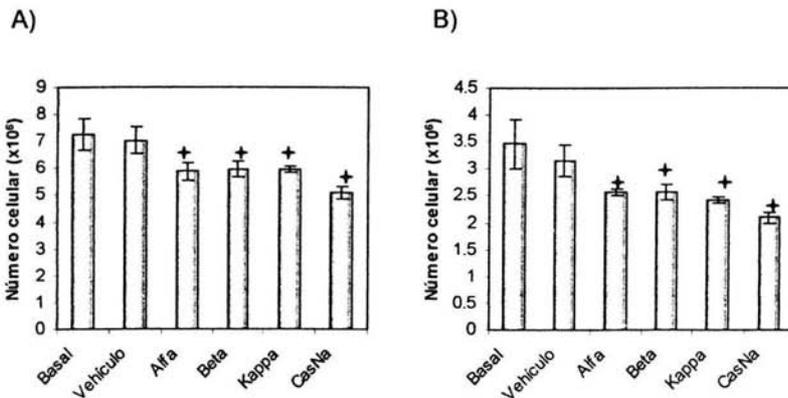


Figura 6. Efecto del caseinato de sodio (CasNa), la alfa, beta y kappa caseína (2mg/ml) en la proliferación de la línea celular 32D (A) y WEHI3 (B) durante 24 horas de cultivo. El vehículo del tratamiento es agua desionizada estéril. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto al vehículo (†).

Para cubrir con nuestros objetivos, fue necesario confirmar que las caseínas y el CasNa efectivamente frenan la proliferación, incluso a las 24 horas de cultivo, sin alterar la viabilidad celular. Para ello fue necesario cultivar células 32D (3×10^6 cel/ml) y WEHI3 (2×10^6 cel/ml) en presencia y ausencia de CasNa, α -, β - y κ -caseína

(2mg/ml) durante 24 horas. Los resultados indican que todas las caseínas muestran un efecto inhibitorio sobre la proliferación de ambas líneas celulares sin afectar su viabilidad (Figura 6 y 7).

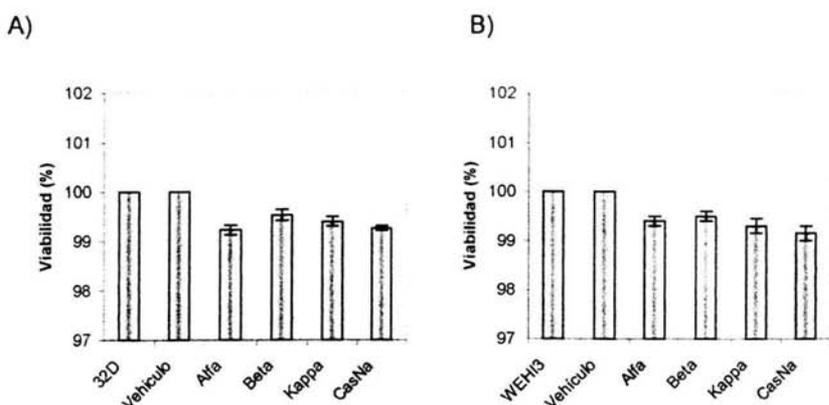


Figura 7. Efecto del caseinato de sodio (CasNa) y las caseínas en la viabilidad celular de la línea 32D (A) y WEHI3 (B) a las 24 hrs. Sin diferencia significativa ($P < 0.05$).

El CasNa, la α -, β - y κ - caseína inducen la expresión de mRNA del gen M-CSF y de su receptor en la línea celular 32D.

La disminución en el índice de proliferación celular (sin que se afecte la viabilidad) puede implicar que existe diferenciación en las células. Tomando en cuenta que el factor específico que induce diferenciación hacia linaje monocito-macrófago es el M-CSF, y se tienen como antecedentes que el CasNa y la α -, β - y κ - caseína inducen diferenciación hacia este linaje en la línea 32D y disminuyen la proliferación de la línea WEHI3, se procedió a evaluar la capacidad de las caseínas para modular la expresión del gen M-CSF y de su receptor c-fms en las líneas 32D y WEHI3, después de las 24 horas de cultivo en presencia y ausencia de las caseínas (α -, β - y κ -) y el CasNa, mediante la técnica de RT-PCR (Figura 8).

Los resultados muestran que el CasNa, la α -, β - y κ -caseína son capaces de inducir la expresión del gen M-CSF y de su receptor c-fms en células 32D, ya que en

condiciones básicas estas células no expresan este gen (Figura 8 y 9). Por otra parte, ni el estímulo con CasNa o con las caseínas fue capaz de inducir la expresión del gen M-CSF y c-fms en la línea leucémica WEHI3 (Figura 8 y 9).

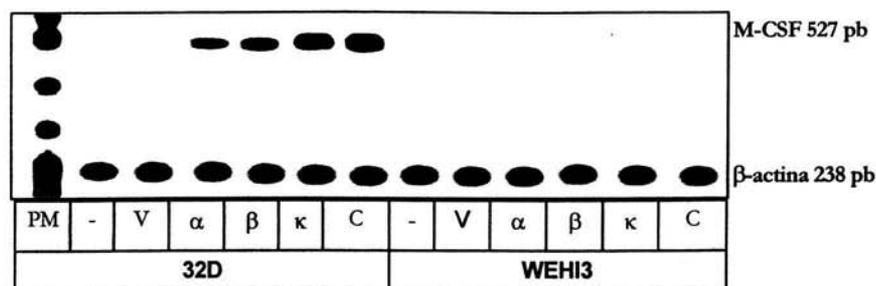
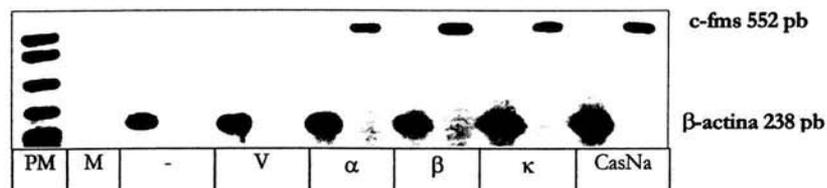


Figura 8. Coamplificación del gen de β -actina y del M-CSF utilizando CasNa (C), alfa (α), beta (β) y kappa (κ) caseína como estímulo en las líneas celulares 32D y WEHI3. PM, pesos moleculares; (-) expresión basal del mRNA; V, vehículo del tratamiento.

32D



WEHI3

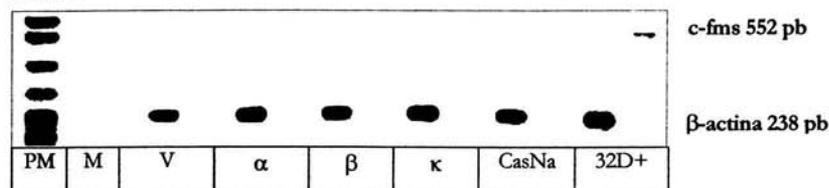


Figura 9. Efecto del CasNa, la alfa (α), beta (β) y kappa (κ) caseína en la expresión del mRNA del gen c-fms en las líneas celulares 32D y WEHI3. PM, pesos moleculares; M, mezcla de reacción de RT-PCR usada como control interno; (-) expresión basal del mRNA; V, vehículo del tratamiento; 32D+, expresión del mRNA de la línea 32D estimulada con CasNa usada como control positivo.

El CasNa, la α -, β - y κ -caseína no inducen la expresión de mRNA del gen GM-CSF en células 32D y WEHI3, aunque sí modulan la expresión de GM-CSFR α .

Considerando que las líneas 32D y WEHI3 pueden ser inducidas a generar células no sólo del linaje monocito-macrófago, sino también del linaje granulocítico, se procedió a determinar la capacidad del CasNa, la α -, β - y κ -caseína como moléculas que pudieran modular la expresión de GM-CSF y de su receptor. Después de 24 horas de cultivo de las células 32D con CasNa, α , β y κ caseína se mostró que hay una inducción marginal en la expresión del GM-CSF en la línea 32D, mientras que la línea leucémica WEHI3 expresa este factor de desarrollo de forma constitutiva y la adición de caseínas no modificó esta expresión (Figura 10). Por otra parte el CasNa y las caseínas (α -, β - y κ -) fueron capaces de inducir la expresión de la subunidad α del receptor GM-CSFR en ambas líneas celulares (Figura 11).

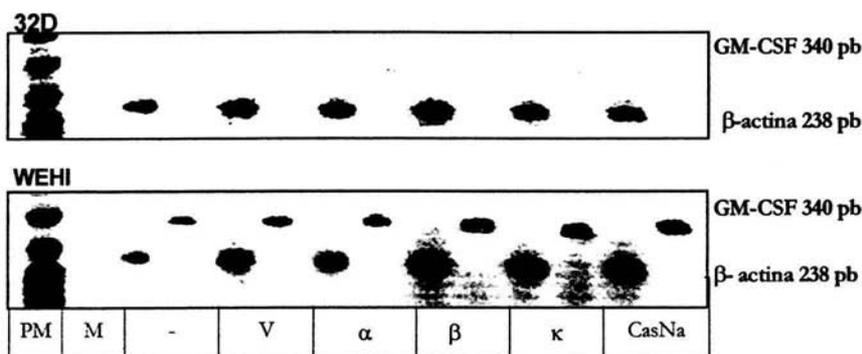


Figura 10. Efecto del CasNa y la alfa (α), beta (β) y kappa (κ) caseína en la expresión del RNAm del gen GMCSF en las líneas celulares 32D y WEHI3. PM, pesos moleculares; M, mezcla de reacción de RT-PCR usada como control interno; (-) expresión basal del mRNA; V, vehículo del tratamiento.

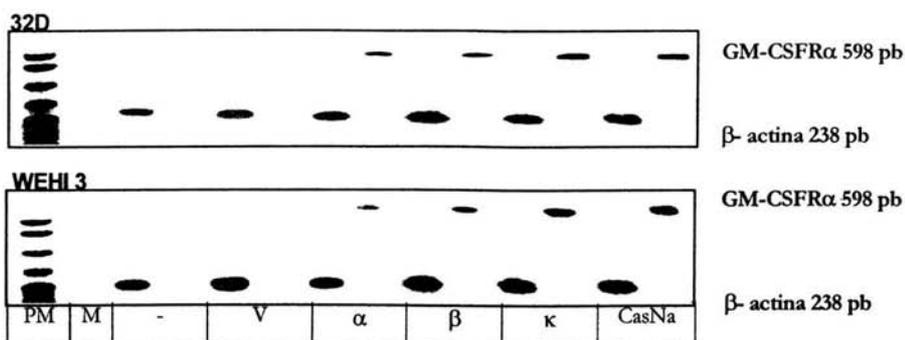


Figura 11. Efecto del CasNa y la alfa (α), beta (β) y kappa (κ) caseína en la expresión del mRNA del GM-CSFR α en las líneas celulares 32D y WEHI3. PM, pesos moleculares; M, mezcla de reacción de RT-PCR usada como control interno; (-) expresión basal del mRNA; V, vehículo del tratamiento.

El CasNa, la α -, β - y κ -caseína inducen la expresión de mRNA para las dos isoformas del gen Fc γ R tipo II en las líneas celulares 32D y WEHI3, pero no para los tipos I y III.

Tomando en cuenta que el CasNa induce la formación de rosetas en células 32D, un parámetro usado para detectar la presencia de receptores Fc en la membrana celular (Ramos, *et al* 2000), se analizó la expresión de los genes para los tres tipos de Fc γ R en células estimuladas con CasNa. Después de cultivarse células 32D y WEHI3 durante 6 y 24 horas en presencia y ausencia de CasNa, se determinó su efecto en la expresión de Fc γ R. Los resultados muestran que el CasNa induce la expresión de las isoformas Fc γ RIIB1 y Fc γ RIIB2 a partir de las 6 horas y esta expresión continúa a las 24 horas en las líneas celulares 32D y WEHI3, sin afectar la expresión de los receptores Fc γ RI y Fc γ RIII (Figura 12).

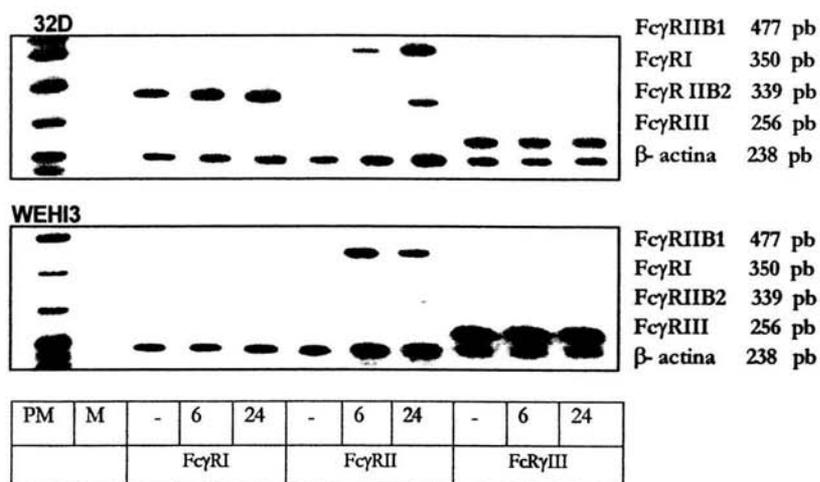


Figura 12. Efecto del CasNa a las (6) y (24) horas de cultivo en la expresión del mRNA de los genes FcγR en células 32D y WEHI3. PM, pesos moleculares; M, mezcla de reacción de RT-PCR usada como control interno; (-) expresión basal del mRNA.

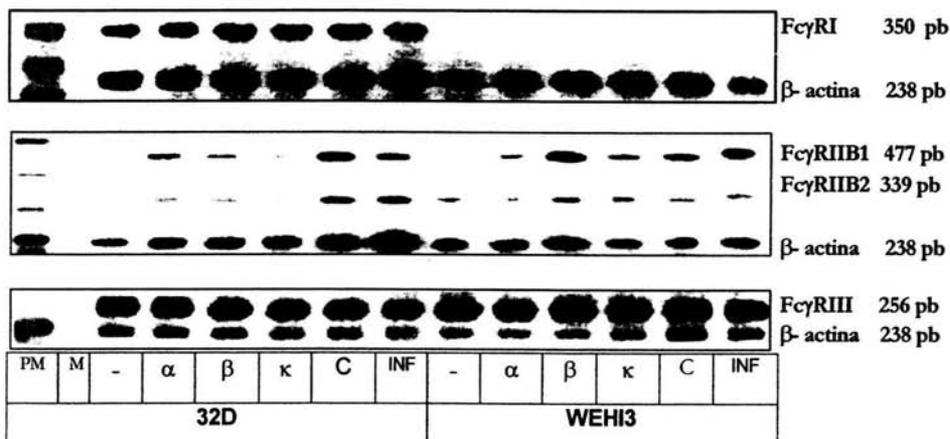


Figura 13. Efecto del INFγ (INF), CasNa (C), alfa (α), beta (β) y kappa (κ) caseína a las 6 horas de cultivo en la expresión del mRNA de los genes FcγR en las líneas 32D y WEHI3. PM, pesos moleculares; M, mezcla de reacción de RT-PCR usada como control interno; (-) expresión basal del mRNA.

Para conocer si las caseínas, al igual que el CasNa tenían un efecto en la expresión de los tres tipos de Fc γ R, se evaluó su efecto, usando como control positivo al INF γ . La expresión de Fc γ RI en la línea 32D es constitutiva y no se ve afectada su expresión por la adición del CasNa ni de las caseínas al cultivo (Figura 13), mientras que en la línea WEHI3 su expresión es marginal o nula y no se ve afectada por el uso del INF γ como estímulo. Por otro lado, los resultados muestran que el INF γ , CasNa, la α -, β - y κ -caseínas mostraron un efecto inductor en la expresión de las dos isoformas del gen Fc γ RII en la línea normal 32D y en la leucémica WEHI3. Estos mismos estímulos no fueron capaces de afectar la expresión del receptor Fc γ RIII en la línea 32D y WEHI3.

XI. DISCUSION

Nuestro grupo ha mostrado que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína, inhibe la proliferación e induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago en la línea hematopoyética multipotencial de ratón 32D (Ramos *et al*, 2000), así como la inducción a la expresión del mRNA del M-CSF y su receptor el *c-fms* (Ramos *et al*, 2004), moléculas que regulan específicamente el comprometimiento y diferenciación de precursores mieloides hacia el linaje monocito-macrófago (Sweet & Hume, 2003).

La caseína de la leche esta integrado por la α -, β - y κ -caseína (Marchesseau, *et al* 2002., Sorensen & O'donnell, 2003), por tanto el CasNa, al ser una sal de la caseína, también esta integrado por las mismas moléculas. En este trabajo, se muestra que la α -, β - y κ -caseína, al igual que el CasNa, inducen la expresión del mRNA para el M-CSF en las células 32D, ya que este gen no se expresa constitutivamente en esta línea celular (Figuras 8) (Soddu *et al*, 1996). Por otro lado, la detección de la expresión basal del receptor del M-CSF (*c-fms*, también denominado M-CSFR) no fue posible, incluso existen reportes, en los cuáles realiza la transfección de este gen para que ocurra tal expresión (Pierce *et al*, 1990., Soddu *et al*, 1996) o de la generación de clones de células 32D que responden a G-CSF y sólo un estímulo de 10 días con este factor permite detectar su expresión (Kreider *et al*, 1990) Sin embargo, en nuestras condiciones de cultivo, la adición de caseínas es suficiente para inducir la expresión del *c-fms*. Datos preliminares de nuestro laboratorio indican que también existe un incremento *c-fms* a nivel proteína en la membrana de las células 32D, lo cual indica que las caseínas inducen la expresión no solo del mRNA, si no que también de la proteína, así las caseínas parecen ser potentes inductores de *c-fms* en las células 32D.

En cuanto a la expresión del mRNA para el GM-CSF y su receptor (GM-CSFR α) en las células 32D cultivadas en ausencia de caseínas es nula (Figuras 10 y 11), lo cuál puede explicar, el hecho de que la adición de GM-CSF al cultivo de estas células no tiene efecto (Migliaccio *et al*, 1989., Kreider

et al, 1990). Por otro lado, la adición de las caseínas no modifica, o lo hace marginalmente, la expresión del mRNA para el GM-CSF, dato que se correlaciona con la ausencia de GM-CSF en el sobrenadante del cultivo de células 32D tratadas con CasNa, ya que la actividad estimuladora de colonias de este sobrenadante fue totalmente bloqueada con la adición del anticuerpo anti M-CSF (Ramos *et al*, 2004) Bajo este contexto, la inducción de M-CSF y su receptor en las células 32D tratadas con caseínas sugiere que estas moléculas pueden ser las responsables de inducir diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago (Ramos *et al*, 2000), por lo que, en un futuro sería interesante continuar evaluando esta posibilidad.

Teniendo como antecedente que el CasNa aumenta la expresión de rosetas (indicador de la expresión de receptores Fc) (Ramos *et al*, 2000); se mostró que las caseínas y el CasNa, tienen la capacidad de inducir la expresión del mRNA de las isoformas Fc γ RIIB1 y Fc γ RIIB2 (Figuras 12 y 13). Considerando que las células 32D tratadas con caseínas se diferencian hacia macrófagos y que existen estudios que indican que la expresión Fc γ RIIB es un índice de comprometimiento mieloide y posiblemente de dirección hacia el linaje monocito-macrófago (Fridman *et al*, 1992), podemos decir que el aumento de rosetas de 10% al 54% en células 32D tratadas con CasNa puede ser consecuencia de la inducción de la expresión de Fc γ RIIB (Ramos *et al*, 2000)

Datos no publicados de nuestro laboratorio, indican que las caseínas inhiben la proliferación de células de la línea leucémica mielomonocítica de ratón WEHI3. En este trabajo, se muestra por primera vez que las células WEHI3 no expresan mRNA para M-CSF y c-fms en forma constitutiva y que la adición de la α -, β - y κ -caseína así como el CasNa no inducen tal expresión (Figuras 8 y 9). Este dato llama la atención, ya que las células de la línea leucémica WEHI3 no sólo crecen como blastos no diferenciados, sino que también se observan células con morfología de macrófagos y granulocitos (Li & Sartorelli, 1992; Kajigaya *et al*, 1989., Metcalf, 1998), lo cual sugiere la posibilidad de que durante el proceso de transformación maligna, se perdió la

capacidad de expresión de estos genes específicos del linaje monocito-macrófago. Una posible explicación es la expresión deficiente del factor de transcripción STAT1 en las células WEHI3 (Lucas *et al*, 1998), ya que este factor participa de forma directa en la inducción de M-CSF y c-fms en ratón (Morris, 1991).

Debido a que el GM-CSF y el M-CSF han mostrado ser equivalentes en su capacidad para estimular el patrón de activación y las funciones de monocitos (Witsell & Shook, 1991., Bober *et al*, 1995) era probable que el CasNa y las caseínas pudieran modular la expresión del GM-CSF en al línea WEHI3. Encontramos que el GM-CSF se expresa en forma constitutiva y su expresión no es alterada por la adición de caseínas (Figura 10), lo cuál no nos sorprende, ya que en la línea WEHI3 tanto el gen de la IL-3 como el del GM-CSF se expresan de forma constitutiva (Cockerill *et al*, 1999), e incluso pueden ser responsables del fenotipo maligno (Cools *et al*, 2002). Sin embargo, nosotros no detectamos la expresión constitutiva del receptor para el GM-CSFR α , lo cuál sugiere que en la malignidad de WEHI3 es difícil que esté participando el GM-CSF.

La expresión del receptor para el GM-CSF en la línea WEHI3 es inducible (Smith *et al*, 1997., Ashihara *et al*, 1997). Nosotros mostramos que la caseína también induce la expresión de GM-CSFR α en esta línea celular (Figura 11). Sería interesante evaluar la participación del GM-CSF en la corrección de la malignidad de células WEHI3.

Al igual que en la línea 32D, las caseínas estimularon positivamente a la línea WEHI3 para expresar las dos isoformas del gen para Fc γ RII, aparentemente sin modificar la expresión marginal o nula del receptor tipo I, ni la expresión constitutiva del receptor tipo III. Comprobamos que el INF γ estimula la expresión de Fc γ RII en células WEHI3 (Lucas *et al*, 1998), pero no fue capaz de modular la expresión del receptor Fc γ RI y Fc γ RIII bajo nuestras condiciones de cultivo (Figura 13). Sería interesante en un futuro evaluar si la expresión del mRNA para Fc γ RII se traduce a proteína funcional. La

confirmación de este dato es interesante ya que el Fc γ RII es un receptor inhibidor de la respuesta inmune y su ausencia se correlaciona con el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Fernández *et al*, 2002a., Dijstelbloem *et al*, 2002), así el uso de la caseína podría ayudar a corregir problemas de salud relacionados con la expresión de Fc γ RII.

Es indudable el efecto que muestran las caseínas en la regulación de la expresión de genes específicos del linaje monocito-macrófago lo cual sugiere que el modo de acción de las caseínas es mediante la producción de citocinas, producción que se ha visto ocurre después de la administración in vivo de caseína y CasNa en ratones (Lotem & Sachs, 1985., Metcalf *et al*, 1996). Debido a lo anterior, surge la necesidad de seguir investigando los mecanismos por los cuáles el CasNa y las caseínas son capaces de modular la hematopoyesis. Además, obligatoriamente se debe de determinar si se traducen las proteínas para las que codifican los genes que aquí se muestran son inducibles por las caseínas y el CasNa, datos que nos permitirán vislumbrar un posible uso terapéutico de las moléculas estudiadas.

XII. CONCLUSIONES

- El CasNa y las caseínas inducen la transcripción de los genes M-CSF y c-fms en la línea normal 32D, pero no en la leucémica WEHI3.
- El CasNa y las caseínas inducen la transcripción del GM-CSFR α , pero lo hacen en forma marginal con su ligando en la línea normal 32D. Congruentemente, la línea leucémica WEHI3, expresa de forma inducida el GM-CSFR α , mientras que el GM-CSF lo expresa constitutivamente.
- El CasNa y las caseínas inducen la transcripción de las isoformas Fc γ RIIB1 y Fc γ RIIB2 en la línea normal 32D, aparentemente sin afectar la expresión constitutiva de los receptores Fc γ RI y Fc γ RIII.
- El CasNa y las caseínas inducen la transcripción de las isoformas Fc γ RB1 y Fc γ RB2 en la línea leucémica WEHI3, aparentemente sin afectar la expresión constitutiva del receptor Fc γ RIII, ni lograr la inducción del receptor Fc γ RI.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abboud S, Bunegin M, Ghosh-Choudhury N, Woodruff K. 2003. Analysis of the mouse CSF-1 gene promoter in a transgenic mouse model. *J Histochem Cytochem*; 51: 941-949.
2. Aguirre de Avalos M, Quintana R, Brandan N. 2002. Citoquinas. Cátedra de Bioquímica. UNNE; 1-19.
3. Aittomäki S, Yang J, Scott E, Simon C, Silvennoinen O. 2002. Distinct functions for signal transducer and activator of transcription 1 and PU.1 in transcriptional activation of Fc γ RI promoter. *Blood*; 100: 1078-1080.
4. Aschkenazy A. 1968. Influence of certain ant metabolites (aminopterin, 6-mercaptopurine, prednisolone and chloramphenicol) on the restoration of lymphopoiesis after an experimental nitrogen inanition. *Siencias Soc Biol Fil*; 19: 652-657.
5. Ashihara E, Vannuchi M, Miglaccio G, Miglaccio R. 1997. Growth factor receptor expression during in vitro differentiation of partially purified populations containing murine stem cells. *J Cel Physiol*; 171: 343-356.
6. Basu S, Dunn A, Wars A. 2002. G-CSF: function and modes of action. *Inter J Mol Med*; 10: 3-10.
7. Bautista M. 1998. Efecto de factores activadores y diferenciadores sobre el granulocito-neutrófilo en banda: Diferenciación, fragmentación del ADN y producción de M-CSF. Tesis licenciatura, FES Zaragoza, UNAM.
8. Begley C, Lopez N, Nicola D, Warren M, Vadas C, Sanderson J, Metcalf D. 1986. Purified colony stimulating factor enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony stimulating factors. *Blood*; 68: 162-166.
9. Beigier-Bompadre M, Barrionuevo P, Alves-Rosa F, Rubel, C, Palermo M, Isturiz M. 2003. The formyl peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine down regulates the expression of Fc γ Rs in interferon gamma activated monocytes/macrophages in vitro and in vivo. *Scand J Immunol*; 57: 221-228.
10. Benitez H. 2002. Epidemiología de las enfermedades hematológicas en el ámbito nacional. *Gac Med Mex*; 138: 1-8.
11. Billadeau D & Leibson P. 2002. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest*; 109: 161-168.
12. Blanchard K, Micheline-Norris B, Pearson C, McMillen S, Cjeu J. 1991. Production of Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) by monocytes and large granular lymphocytes stimulated with *Mycobacterium avium*-M- intracellular: activation of bactericidal by GM-CSF. *Infect and Immunity*; 59: 2396-2402.
13. Bober L, Grace M, Pugliese-Sivo C, Rojas-Triana A, Sullivan L, Narula S. 1995. The effects of colony stimulating factors on human monocyte cell function. *Int J Immunopharmacol*; 17: 385-92.
14. Bost K, Bento J, Ellington J Marriot I, Hudson M. 2000. Induction of colony stimulating factor expression following *Staphylococcus* or *Salmonella* interaction with mouse or human osteoblasts. *Infect Immunity*; 68: 5075-5083.
15. Brophy B, Smoleski G, Wheeler T, Wells D, Huillier P, Laible G. 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β - casein and κ - casein. *Nature biotech*; 21: 157-162.
16. Calcagno M, Pérez J, Waldo M, Cabrera G, Weiss B. 1982. Evidence of the existence of a factor that induces Fc receptors on bone marrow cells. *Blood*; 59: 756-760.
17. Chapolov A, Kamdar S, Kremlev S, Evans R. 1998. CSF-1 (M-CSF) differentially sensitizes mononuclear phagocyte subpopulations to endotoxin in vivo: a potential pathway that regulates the severity of gram-negative infections. *J Leuk Biol*; 63: 245-252.
18. Chuang F, Sassaroli M, Unkeless J. 2000. Convergence of Fc γ Receptor IIA and Fc γ Receptor IIIB signaling pathways in human's neutrophils. *J Immunol*; 164: 350-360.
19. Cockeril P, Bert A, Roberts D, Vadas M. 1999. The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene is autonomously regulated in vivo by an inducible tissue-specific enhancer. *Proc Natl Acad Sci*; 95: 15097-15102.
20. Cools J, Menten N, Odero M, Peeters P, Woldarka I, Marynen P. 2002. Evidence for position effects as variants ETV6-mediated leukemogenic mechanism in myeloid leukemias with a t(4;12) (q11-q12;p13) or t(5;12) (q31;p13). *Blood*; 99: 1776-1784.
21. Córdova Y. 2003. Participación del interferón gamma (INF γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleucina 1 beta (IL-1 β) en la modulación de la expresión de receptores Fc gamma (Fc γ R) en la línea celular progenitora mielóide 32D. Tesis licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
22. Dahlström J. 2001. Feedback Enhancement of Antibody Responses via Complement and Fc Receptors. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Upsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1000; 53.
23. Dalgleish D. 1998. Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *J Dairy Sci*; 81: 3013-3018.
24. DeKoter R, Walsh J and Singh. 1998. PU.1 regulates both cytokine dependent proliferation and differentiation of granulocyte macrophage progenitors. *EMBO Journal*; 17: 4456-4468.

25. Dey A, She H, Kim L, Boruch A, Guris D, Carlberg K, Sebt S, Woodley D, Imamoto A, and Li W. 2000. Colony stimulating factor-1 utilizes multiple signaling pathways to induce cyclin D2 expression. *Mol Biol Cell*, 11: 3835-3848.
26. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna S, Cotter T. 2000. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist*; 5: 405-415.
27. Di Paola L, Marrelli L, Maschiotti M, Milozzi R, Terranova A. 2000. Solubility of caseins in ammonium sulphate aqueous solutions. University of Rome "La Sapienza": 1-5.
28. Díaz M, Dunn C, McClements J, and Decker E. 2003. Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil in water emulsions. *J Agric Food Chem*; 31: 2363-2370.
29. Dijkstra H, Jan G, Kallenberg G. 2002. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *T Immunol*; 22: 510-516.
30. Fernández C, Rubel C, Barrionuevo P, López L, Ramírez F, Díaz M. 2002a. Phenotype markers and function of neutrophils in children with hemolytic uremia syndrome. *Pediatr Nephrol*; 17: 337-344.
31. Fernández N, Renedo M, García R, Sánchez, M. 2002b. Activation of monocyte cells through FcγR receptors induces the expression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1α, MIP-1β and RANTES. *J Immunol*; 169: 3321-3328.
32. Ferrateto A, Signorile A, Gravani C, Fiorilli A, Tettamanti G. 2001. Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal HT-29 tumor cells. *Biochem Mol Act of Nutri*; 43: 1655-1660.
33. Fiat A, Aigliomere-Samour D, Jolles P, Drouet L, Sollier C, Caen J. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antitrombotic and immunomodulatory activities. *J Dairy Sci*; 76: 301-310.
34. Flores F, Santiago E, Weiss B. 1998. Receptores Fcγ en Salud y Enfermedad. *Rev Invest Clin*; 50:529-540.
35. Fridman W, Bonerot C, Daeron M, Amigorena S, Teillaud J, Saurtes C. 1992. Structural bases of Fcγ receptor function. *Immunol Rev*; 125: 49-75.
36. Gemtsen B V. 2001. Of buttons, digestion and glue. *Protein spotlight*; 1-2.
37. Grey A, Chen Y, Palival I, Carlberg K, Insogna K. 2000. Evidence for functional association between phosphatidylinositol 3 kinase and c-src in the spreading response of osteoclasts to colony stimulating factor-1. *Endocrin*; 141: 2129-2138.
38. Guidez F, Li A, Horvai A, Welch J, Glass C. 1998. Differential utilization of Ras signaling pathways by macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF receptors during macrophage differentiation. *Mol Cell Biol*; 18: 3851-3861.
39. Hao Q, Thiermann F, Petersen D. 1996. Extended long term culture reveals a highly quiescent and primitive human haematopoietic progenitor population. *Blood*; 88: 3306-3313.
40. Hasegawa Y, Bai A, Kojima H, Komeno T, Ninomiya H, Nagasawa T. 2000. Priming effects of macrophage colony stimulating factor on monocytic leukemia cells in combination with chemotherapy: induction of programmed cell death in vivo. *Leuk Lymphoma*; 36: 589-593.
41. Hashimoto S, Yamada M, Motoyoshi K, Akagawa K. 1997. Enhancement of macrophage colony stimulating factor induced growth and differentiation of human monocytes by interleukin 10. *Blood*; 89: 315-321.
42. Hawley R & Sobiesky D. 2003. *Stem cell molecular blueprint: life, the universe, and everything*. *Stem Cells*; 21: 1-4.
43. Hewit R, Morse G, Lawrence W, Maliszewski M, Santora J, Bartos L, Bonnem E, Poesz B. 1993. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and zidovudine in patients with AIDS and severe AIDS related complex. *Antimicrob Agents Chemother*; 37: 512-522.
44. Hira T, Hiroshi H, Tomita F, Aoyama Y. 2003 Casein binds to the cell membrane and induces intracellular calcium signals in the enteroendocrine cell: a brief communication. *Enteroendocrine cell and dietary protein*. *Exp Biol Med*; 228: 850-854.
45. Hogarth P. 2002. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*; 14: 798-802.
46. Hohaus S, Petrovick M, Voso T, Sun Z, Zhang D, Tenen D. 1995. PU.1 (Spi-1) and C/EBPα regulate expression of the granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor α gene. *Mol Cell Biol*; 15: 5830-5845.
47. Hulett M, Hogarth P. 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol*; 57: 1-127.
48. Husson H, Mograbi B, Schmid-Antomarchi H, Fischer S, Rossi B. 1997. CSF-1 stimulation induces the formation of a multiprotein complex including CSF-1 receptor, c-Cbl, PI 3-kinase, Crk-II and Grb2. *Oncogene*; 14: 2331-2338.
49. Jiang Y, Hirose S, Abe M, Sanokawa R, Ohtsui, Mi X, Li N, Zhang D, Shirari, J, Harmano Y, Fujii H, Shirai T. 2000. Polymorphisms in IgG receptor IIB regulatory regions associated with autoimmune susceptibility. *Immunogenetics*; 51: 429-435.
50. Kajigaya Y, Ikuta K, Sasaki H, Funabiki T, Koiso Y, Matsuyama S. 1989. The production of differentiation autoinducing activity by WEHI-3B D+ leukemia cells. *Exp Hematol*; 17: 368-373.

51. Katatchkine M & Kaveri S. 2001. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *J Med*; 345: 747-755.
52. Kato I, Takai T, Kudo A. 2002. The pre-B cell signaling for apoptosis is negatively regulated by FcγIIb. *J Immunol*; 168: 629-634.
53. Kaufman D, Hanson E, Lewis R, Auerbach R, Thomson J. 2001. Haematopoietic colony forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*; 98: 10716-10721.
54. Kim J, Peng X, De P, Geahm R, Durden D. 2002. PTEN controls immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling and the activation of Rac. *Blood*; 99: 694-699.
55. Kreider B, Phillips P, Prystowsky M, Shirsat N, Pierce J, Tushinski R, et al. 1990. Induction of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor by granulocyte CSF increases the differentiate options of a murine hematopoietic progenitor cell. *Mol Cell Biol*; 10: 4846-4853.
56. Kumosinski T, Brown E, Farrell H. 1991. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: kappa casein. *J Dairy Sci*; 74: 2879-2887.
57. Lahov E & Regelson W. 1996. Antibacterial and immunostimulating casein derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol*; 34: 131-145.
58. Ledesma E. 2002. Estudio de la participación del factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y del factor de crecimiento transformante beta 1(TGFβ1) en la inhibición de la proliferación de la línea celular mielóide multipotencial 32D de ratón estimulada con interleucina 1 beta (IL-1β). Tesis licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.
59. Li J, Sartorelli A. 1992. Synergistic induction of the differentiation of WEHI3BD+ myelomonocytic leukemia cells by retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor. *Leuk Res*; 16 571-576.
60. Liu H, Grundström T. 2002. Calcium regulation of GM-CSF by calmodulin-dependent kinase II phosphorylation of Ets. *Mol Biol Cell*; 13: 4497-4507.
61. Liu R, Liu H, Chen X, Kirby M, Brown P, Zhao K. 2001. Regulations of CSF-1 promoter by the SWI/SNF like BAF complex. *Cell*; 106: 309-318.
62. Lotem J, Sachs L. 1985. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer*; 35: 93-100.
63. Lucas D, Lokuta M, McDowell M, Doan J, Paulnock D. 1998. Analysis of the IFNγ Signaling Pathway. *J Immunol*; 160: 4337-4342.
64. Marchesseau S, Mani J, Martineau P, Cuq J, Pugniere M. 2002. Casein interactions studied by the surface resonance technique. *J Dairy Sci*; 85: 2711-2721.
65. Mayani H. 2003. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch of Med Research*; 34: 3-15.
66. Melendez A, Floto A, Cameron J, Gillyoly D, Harnett M, Allen J. 1998. A molecular switch changes the signaling pathway used by the FcγRI antibody receptor to mobilize calcium. *Curr Biol*; 8: 210-221.
67. Metcalf D, Robb L, Dunn A, Mifsud S and Di Rago L. 1996. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood*; 88: 3755-3764.
68. Metcalf D. 1998. Lineage commitment and maturation in haematopoietic cells: The case for extrinsic regulation. *Blood*; 92: 345-347.
69. Migliaccio G, Migliaccio A, Kreider B, Roverm G, Adamson J. 1989. Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at different stages of hematopoietic differentiation from the murine cell line 32D. *J Cell Biol*, 109: 833-841.
70. Morris S. 1991. Reassignment of the human CSF1 gene to chromosome 1p13-p21. *Blood* 78: 2013-2020.
71. Morrisey P, Bressler L, Park S, Albert A, Gillis S. 1987. Granulocyte macrophage colony stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen presenting cells. *J Immunol*; 139: 113-1119.
72. Mulvihill D & Fox P. 1979. Proteolytic specificity of chemosin on bovine alpha s1 casein. *J. Dairy Res*; 46: 641-651.
73. Nakajima M, Shinoda I, Samejima Y, Miyauchi H, Fukuwatari Y, Hayasawa H. 1996. Kappa-casein suppresses melanogenesis in cultured pigment cells. *Pigment Cell Res*; 9: 235-239.
74. Nichio M & Burns G. 1992. Granulocyte-macrophage colony stimulating factors differentially regulate αv integrin expression on cultured human macrophages. *Proc Natl Acad Sci*; 90: 2517-2521.
75. Okada H, Bolland S, Hashimoto A, Kurosaki M, Kabuyama Y, Iino M, Ravetch J and Kurosaki T. 1998. Cutting edge: Role of the inositol phosphatase SHIP in B cell receptor induced Ca2+ oscillatory response. *J Immunol*; 161: 5129-5132.
76. Okano M, Ohnoda H, Sasaki R. 1992. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J Nutr*; 122: 1376-1383.
77. Orlie, D. Anderson, A., Biesecker, L., Sorrentino, B. and Bodine, D. 1995. Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myc

- and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proc Natl Acad Sci*; 92: 4601-4605.
78. Ortmann R, Cheng T, Visconti R, Fruncht D, O'shea J. 2000. Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation. *Arthritis Res*; 2: 16-32.
 79. Pan L, Kreisler R, Shi Y. 1998. Detection of FcγR on human endothelial cells stimulated with cytokines tumor necrosis factor alpha (TNFα) and interferon gamma (INFγ). *Clin Exp Immunol*; 112: 533-538.
 80. Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G. 1993. The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Med Farmacol*; 2: 71-81.
 81. Passegué E, Jamieson C, Allies L, Weissman I. 2003. Normal and leukemic haematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci*; 100: 11042-11049.
 82. Pessi T, Isolauri E, Sujas Y, Kankaanranta H, Moilanen E, Hurme M. 2001. Suppression of T-cell activation by *Lactobacillus rhamnosus* GG- degraded bovine casein. *Immunopharm*; 1: 211-218.
 83. Pierce, J, Di Marco E, Cox G, Lopmbardi D, Ruggiero M, Di Fiore P, Aaronson, S. 1990. Macrophage-colony stimulating factor (CSF-1) induces proliferation, chemotaxis, and reversible differentiation in myeloid progenitor cells transfected with the human c-fms/CSF-1 receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci*; 87: 5613-5617.
 84. Qin D, Wu J, Vora K, Ravetch J, Szakal A, Manser T and Tew J. 2000. Fcγ Receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. *J Immunol*; 164: 6268-6275.
 85. Raivich G, Hass S, Werner A, Klein M A, Kloss C, Kreutzberg G.1998. Regulation of M-CSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *J Compara Neurol*; 395: 342-358.
 86. Ramos G, Santiago E, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. 2000. El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Invest Clin*; 52: 638-644.
 87. Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. 2004. Sodium caseinate induces murine multipotent myeloid cell line 32D to express and secrete macrophage colony stimulating factor. *Arch of Med Research*; 56:1-5.
 88. Ravetch J. 1994. Fc receptors: Rubor redux. *Cell*; 78: 553-560.
 89. Ravetch J, Clynes R. 1998. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annu Rev Immunol*; 16: 421-443.
 90. Ridley A. 2001. Rho proteins PI 3 kinases, and monocyte/macrophage motility. *FEBS letters*; 498: 168-171.
 91. Rudge E, Cutler J, Ritchard R, Smith K. 2002. Interleukin 4 reduces Expression of Inhibitory Receptors on B Cells and Abolishes CD22 and FcγRII mediated B Cell Suppression. *J Exp Med*; 195: 1079-1085.
 92. Ryan G, Dai X, Dominguez M, Tong W, Chuan F, Chisholm O, Ruseel R, Pollard J, Stanley R. 2001. Rescue of the colony stimulating factor 1 (CSF-1) nullizygous mouse (Cs1^{0/0}) phenotype with a CSF-1 transgene and identification of sites of local CSF-1 synthesis. *Blood*; 98: 74-84.
 93. Sachs L. 1996. The control of haematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci*; 93: 4742-4749.
 94. Sandré A, Gleizes A, Forestier F, Gorges R, Chilmoneczyk S, Léonil J, Moreau M, Labarre C. 2001 A peptide derived from Bovine β-casein modulates functional properties of bone marrow derived macrophages from germfree and human flora associated mice. *J Nutr*; 131: 2936-2942.
 95. Sandor M, Galon J, Takacs L, Tatsumi Y, Mueller A, Sautes C, Lynch. 1994. An alternative Fc gamma receptor ligand: potential role in T cell development. *Proc Natl Acad Sci*. 91:12857-12861.
 96. Santiago E, Mora L, Montesinos J, Ventura J, Machuca C, Mendoza J. 1994. Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblasts. *Rev Invest Clin*; 1: 253.
 97. Sapi N & Kacinski M.1999. The role of CSF-1 in normal and neoplastic breast physiology. *Proc Soc Exp Biol Med*; 220:1-8.
 98. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Información en Salud. México: 2001. <http://www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/mortalidad.html>
 99. Shouqing L, Dexian Z, Yanxin L, Qing R, Kefu W. 2000. Analysis of the ligand-binding domain of macrophage colony-stimulating receptor. *Chin Sci Bull*; 45: 1191-1195.
 100. Smith A, Metcalf D, Nicola N. 1997. Cytoplasmic domains of the common β-chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors that are required for inducing differentiation or clonal suppression in myeloid leukaemic cell lines. *Embo J*; 16: 451-64.
 101. Smith C. 2003. Haematopoietic stem cells and haematopoiesis. *Cancer Control*; 10: 9-16.
 102. Soddu S, Blandino G, Scardigli R, Marninelli R, Rizzo M. 1996. Wild type p53 induces diverse effects in 32D cells expressing different oncogenes. *Mol and Cell Biol*; 16: 487-95.
 103. Soldi R, Primo L, Brizzi M, Aglieta M, Polentarutti N, Pegoraro L, Mantovani A, Bussolino F. 1997. Activation of JAK2 in human vascular endothelial cells by granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood*; 89: 863-872.

104. Sorenson C & O'donnell J. Nutritional properties of whey, lactose and milk minerals products. Whey protein institute & California Dairy Research Foundation Davis. 2003, pp. 1-32. http://www.usdec.org/pdf/Manuals/US08D_06.pdf
105. Sweet M & Hume D. 2003. CSF-1 as a regulator of macrophage activation and immune responses. *Arch Immunol Ther Exp*; 51: 169-177.
106. Tagoh H, Himes R, Clarke D, Leenen OP, Riggs A, Hume D, Bonifer C. 2002. Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells. *Gene & Development*; 16: 1721-1737.
107. Tenen D. 2000. Transcriptional regulation of myelopoiesis and myeloid leukemia. Fifth congress of the European hematology association. UK. 169-177.
108. Teschemacher H; Koch G; Brantl V. *Milk protein derived opioid receptor ligands*. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997. p. 99-117.
109. Tkaczyk C, Okayama Y, Woolhiser M, Hagaman M, Gilfillan A, Metcalfe D. 2002. Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor. *Mol Immunol*; 38:1289-1293.
110. Uciechowsky P, Schwarz M, Gessner E, Schimdt R, Resch K. and Radeke H. 1998. INF γ induces the high affinity Fc receptor I for IgG (CD64) on human glomerular mesangial cells. *Eur J Immunol*; 28:2928-2935.
111. Vassiliadis S & Athanassakis I. 1994. Two novel colony stimulating factor 1(CSF-1) properties: it post transcriptionally inhibits interferon specific induction of class II antigens and reduces the risk of fetal abortion. *Citokine*; 6:295-299.
112. Walstra P, Jenners R. 1984. *Dairy chemistry and physics*. New York: John Wiley Sons. 1984, p.106.
113. Wattiaux B. *Milk composition and nutritional value in dairy essentials*. University of Wisconsin-Madison: Babcock Institute for International Dairy Research and Development. 2002, p. 73-77.
114. Weissman I, Anderson D, Gage F. 2001. Stem and progenitors cells: origins, phenotypes, lineage commitments and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 17: 387-403.
115. Wernersson S, Karlsson M, Dahlström J, Mattson R, Verbeek J and Heyman B. 1999. IgG mediated enhancement of antibody response is low in Fc receptor γ chain deficient mice and increased in Fc γ RII deficient mice. *J Immunol*; 163: 618-622.
116. Williams T, Nagarajan S, Selvaraj P and Zhu C. 2000. Concurrent and independent binding of Fc γ Receptors IIa and IIb to surface-bound IgG. *Biophys J*; 79: 1867-1875.
117. Witsell A & Shook L. 1991. Macrophage heterogeneity occurs through a developmental mechanism. *Proc Natl Acad Sci*; 88: 1963-1967.
118. Wong C, Seow H, Liu A, Husband A J, Smithers G, Watson D. 1996. Modulation of immune response by bovine β -casein. *Immunol Cell Biol*; 74: 323-329.
119. Xiao-Hong D, Rivas C, Heaney M, Raines M, Vera J, Golde D. 1994. The α subunit of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation independent pathway. *Proc Natl Acad Sci*; 91: 2537-2541.
120. Yao J, Harvath L, Gilbert DL, Colton C. 1990. Chemotaxis by a CNS macrophage the microglia. *J Neurosci Res*; 27: 36-42.
121. Yeung Y & Stanley E. 2003. Proteomic approaches to the analysis of early events in CSF-1 signal transduction. *Amer Soc Biochem Mol Biol*; 18:711-723.
122. Zambrano I, Santiago E, Weiss B, Cáceres J. 1999. Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev Invest Clin*; 51: 53-68.
123. Zhu J & Emerson S. 2002. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*; 21: 3295-3313.

XIV. ANEXO

- **Agua con dietilpircarbonato (DEPC 0.01%)**

10 μ l dietilpircarbonato

100 ml agua desionizada

Se deja en agitación toda la noche a 37°C y se esteriliza por autoclave.

- **Buffer stock de carga (5ml)**

20 % Glicerol

05 % Xilencianol

0.25 % Azul de Bromofenol

19.25 % Agua desionizada estéril

- **Buffer de corrida de geles**

10 μ l buffer stock de carga

18 μ l glicerol

72 μ l agua desionizada

- **EDTA 0.5M (100ml)**

18.61g EDTA

70 ml agua desionizada

Se ajusta a pH 8 con 10M NaOH y se afora con agua desionizada a 100ml

- **rmIL-3 (Interleucina 3 recombinante murina 1 μ g/100 μ l)**

La solución se reconstituye como 1 ml de albumina 0.1% y se guarda a -72°C.

- **rmINF γ (Interferón gamma recombinante murino 1 μ g/100 μ l)**

La solución se reconstituye como 1 ml de PBS y se guarda a -72°C.

- **TBE 1X (1000 ml)**

10.8 g Triz base

5.5 g Ácido bórico

4 ml EDTA (0.5M pH8)

Se agita la solución y se esteriliza por autoclave.