



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
DEL CÁNCER**

**EFFECTO DE CASOMORFINAS (1-5, 1-7 β -CASOMORFINA Y
90-95 α -CASOMORFINA) EN LA PROLIFERACIÓN Y
DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA MIELOIDE
MULTIPOTENCIAL 32D**

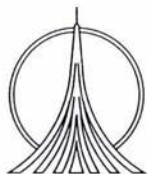
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
MARÍA DE LOURDES ESPEJEL MORALES**

DIRECTOR: BIÓLOGO GERARDO RAMOS MANDUJANO

ASESOR: M. EN C. ÁNGEL GARCÍA SÁNCHEZ

MEXICO, D.F. NOVIEMBRE 2004





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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), FES Zaragoza UNAM. Bajo la dirección del Biol. Gerardo Ramos Mandujano y la asesoría del M. en C. Ángel García Sánchez.

Además, la realización de la investigación de la tesis fue apoyada por el proyecto PAPIIT IN203501, a cargo del Dr. Edelmiro Santiago Osorio.

A Cruz y Alicia, gracias por confiar en mí.

A Josefina, Pedro y Enrique por alentarme siempre.

A Víctor mi gran amigo y compañero por todo

su amor, apoyo y confianza que nos permitió llegar juntos a esta meta.

AGRADECIMIENTOS.

Al Biol. Gerardo Ramos por su paciencia y apoyo para que este trabajo se concluyera satisfactoriamente.

Al M en C Ángel García Sánchez por sus valiosa aportación a este trabajo.

Al Dr. Edelmiro Santiago por las facilidades otorgadas para la realización de nuestra tesis.

A la Q.F.B. Guadalupe Gálvez Hernández por la confianza y tiempo otorgado para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento especial a mis compañeros de carrera que de una u otra forma aportaron algo a esta tesis: Silvestre Ramírez, Marino Alcántara, Hugo Lagunes, Adriana Galván, Edgar Ledesma, Yolanda García y Mónica Ruiz.

In memoria a Antonino Saenz por iniciarme en el gusto por la hematología.

ÍNDICE

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN	2
3.- MARCO TEÓRICO	3
HEMATOPOYESIS	3
Células Hematopoyéticas	4
1) Células Tallo Pluripotentes	6
2) Células Progenitoras Hematopoyéticas	6
3) Células Maduras	8
LÍNEAS CELULARES HEMATOPOYÉTICAS	10
REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS	11
Citocinas	12
1) Quimiocinas	12
2) Factores de Crecimiento Hematopoyético	14
Moléculas de naturaleza diferente a las FCH's que afectan la Hematopoyesis	16
Caseínas y Hematopoyesis	16
CASOMORFINAS	18
Presencia fisiológica	18
Actividades biológicas	19
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
5.- OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
6.- HIPÓTESIS	23
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	24
8.- RESULTADOS	32
9.- ANALISIS DE RESULTADOS	44
10.- CONCLUSIONES	48
11.- BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE ABRVIATURAS

AGM	Aorta/gónada/mesonefro
ATRA	Ácido transretinoico
CFU-	Unidades formadoras de colonias-
CFU-G	Unidades formadoras de colonias de granulocitos
CFU-M	Unidades formadoras de colonias de monocitos
CFU-E	Unidades formadoras de colonias de eritrocitos
CFU-MK	Unidades formadoras de colonias de megacariocitos
CFU-preB	Unidades formadoras de colonias de linfocitos B
CMP	Progenitor común mieloide
CLP	Progenitor común linfoide
CTH	Células tallo hematopoyéticas
CSF	Factor estimulador de colonias de-
LT-HSC	CTH-reconstituyente a largo plazo
ST-HSC	CTH-reconstituyente a corto plazo
DL	Célula dendrítica
DMSO	Dimetil sulfoxido
ECM	Moléculas de matriz extracelular
FCH	Factor de crecimiento hematopoyético
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de monolitos y granulocitos
IFN	Interferón
IL-	Interleucina-
miL-3	Interleucina-3 recombinante de ratón
IMDM	Iscove's Modified Duldecço's Médium
LPS	Linfocitos de sangre periférica
MPP	Progenitor pluripotente
NK	Natural Killer
PMN	Polimorfonuclear

RESUMEN

La hematopoyesis o formación de células sanguíneas, involucra un sin fin de mecanismos, los cuales aún no están completamente dilucidados; sin embargo se sabe que intervienen un gran número de moléculas de origen endógeno que median las interacciones específicas ligando receptor y célula-célula, permitiendo que el proceso de la hematopoyesis esté debidamente regulado, manteniendo así un equilibrio entre la producción y función de las células sanguíneas.

En principio el microambiente hematopoyético (MH) proporciona los factores necesarios para la regulación de la hematopoyesis, sin embargo, existen moléculas de origen exógeno que pueden afectar a las células hematopoyéticas de manera positiva o negativa. Tal es el caso de algunos péptidos derivados de la proteólisis de las caseínas denominados casomorfina, de los cuales se ha reportado que presentan efectos sobre neutrófilos, macrófagos y linfocitos, sin embargo, sus efectos en la hematopoyesis no se conocen. Por lo tanto en el presente trabajo, se evaluaron los efectos de tres casomorfina (1-5 y 1-7 β -casomorfina, 90-95 α -casomorfina) sobre la proliferación, viabilidad y diferenciación de las células progenitoras mieloides 32D.

El conteo celular indicó que sólo la 1-5 y la 1-7 β -casomorfina provocan una disminución significativa de la proliferación de las células 32D. Este efecto en la proliferación no fue consecuencia de disminución de la viabilidad con alguna de las casomorfina. Sin embargo, las evaluaciones morfológicas y las evaluaciones citoquímicas señalaron que ninguna de las casomorfina promovió la diferenciación de las células 32D.

Los resultados sugieren que las casomorfina están regulando de alguna manera la hematopoyesis *in vitro*, lo cual, abre la posibilidad de que este tipo de compuestos afecten la hematopoyesis *in vivo* y tener una aplicación terapéutica en algún desorden en que se involucre al sistema hematopoyético.

INTRODUCCIÓN

La caseína, la principal proteína de la leche, ha sido una excelente fuente nutricional, varios estudios han revelado que tiene diversos efectos biológicos. Ejemplo de ello son los péptidos bioactivos presentes en su estructura primaria conocidos como casomorfina, los cuales pueden ser liberados por proteólisis enzimática tanto *in vivo* como *in vitro*.

Recientemente un estudio realizado en adultos humanos sanos demostró que péptidos bioactivos son liberados en el estómago durante la digestión de leche o yogurt; y dos péptidos (uno derivado de la α -s1 caseína y otro de la β -caseína) con potencial actividad biológica pasaron a la sangre. Además, estudios *in vitro* han revelado que algunas enzimas gastrointestinales tienen la capacidad de generar a partir de las caseínas varios péptidos con actividades biológicas. Por lo tanto, es posible que algunos de estos péptidos sean parcialmente resistentes y absorbidos en cantidades fisiológicamente activas y ejercer un efecto a nivel local en el tubo digestivo o bien a distancia en el organismo una vez que han ingresado al sistema circulatorio.

El descubrimiento de los péptidos bioactivos y su potencial papel fisiológico ha despertado el interés en determinar sus efectos biológicos. Recientemente se ha observado *in vivo* un efecto antihipertensivo relacionado a varios péptidos originados de la α y β - caseína, también se sabe que derivados de la κ -caseína son inhibidores de la agregación plaquetaria y fragmentos de la β -caseína (1-5 β -casomorfina) producen un efecto analgésico y un cambio conductual cuando son inyectados vía intracerebro-ventricular en ratones. Dentro de las actividades biológicas *in vitro*, las casomorfina inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer de seno y próstata. En células hematopoyéticas maduras, se ha observado que afectan la respuesta proliferativa de linfocitos, la producción de radicales libres en neutrofilos y en macrófagos estimulan la fagocitosis de eritrocitos. Sin embargo no se conoce el papel de estos péptidos en la generación de células sanguíneas (hematopoyesis). Por lo anterior en el presente proyecto se evaluarán los efectos de un péptido derivado de α -caseína y dos péptidos derivados de β -caseína en procesos fundamentales de la hematopoyesis como lo es la proliferación, la viabilidad y la diferenciación de progenitores hematopoyéticos.

MARCO TEÓRICO

HEMATOPOYESIS

Los derivados sanguíneos o elementos formes de la sangre cumplen con diversas funciones, por ejemplo los eritrocitos se encargan del transporte de oxígeno, los leucocitos de la defensa del organismo contra la invasión de agentes patógenos y de células propias transformadas; mientras que las plaquetas se encargan de la homeostasis; muchas de ellas mueren en cumplimiento de su función, por lo que existe la necesidad de un constante suministro de nuevas células. La escala de este reemplazamiento es asombrosamente grande, en el adulto cerca de 3×10^6 células rojas llegan al final de su vida cada segundo e igualmente pasa con un número menor de leucocitos, aunque en situaciones como anoxia o infección se requiere un rápido y significativo incremento en la producción de células maduras (Whetton and Dexter, 1989). Al proceso de generación de células hematopoyéticas se le conoce como hematopoyesis.

Los primeros vestigios de células hematopoyéticas aparecen durante el desarrollo embrionario. En el ratón las células hematopoyéticas aparecen a los 7.5 días post coito (dpc), encontrándose células del linaje eritroide dentro de los islotes sanguíneos del saco vitelino y entre el 9-10.5 dpc se pueden observar precursores del linaje linfóide en la región conocida como aorta/gónada/mesonefro (AGM) y cerca del 12 dpc aparecen las primeras células tallo hematopoyéticas (CTH) capaces de generar todos los linajes hematopoyéticos; posteriormente las CTH migran hacia los órganos encargados de mantener la hematopoyesis durante toda la vida del ratón (Cumano, 2001). Mientras tanto en el humano, la eritropoyesis fetal inicia en el saco vitelino a los 19 dpc y entre el primer y tercer mes se inicia la hematopoyesis en órganos como el hígado, bazo, timo y nódulos linfáticos. Cerca del cuarto mes de gestación se inicia la hematopoyesis en la médula ósea, y para el sexto mes ya es el sitio primario de la hematopoyesis (Mackenzie, 2000). Después del nacimiento y durante toda la vida, la hematopoyesis se centraliza en la médula ósea, situada en las trabéculas del hueso esponjoso, (fémur (4%), pelvis (34%), vértebras (28%), esternón y costillas (10%), en donde encuentra las condiciones ideales para la proliferación, maduración y diferenciación de las células sanguíneas (Ruiz, 2003) (Figura 1).

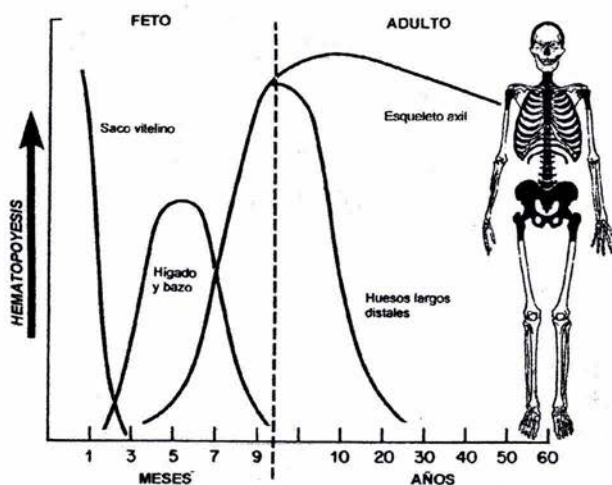


FIGURA1. Localización de la hematopoyesis en la etapa prenatal y postnatal del humano. Tomado y modificado de Ruiz, 2003.

Células Hematopoyéticas

Con base en diversos estudios que se han realizado tanto *in vivo* (principalmente en ratones) como *in vitro* (con células de ratón y humano), durante las últimas tres décadas ha sido posible elaborar un modelo sobre la organización estructural de las células hematopoyéticas. Por lo tanto la jerarquización podría establecerse de la siguiente manera: células tallo pluripotentes, células progenitoras multi y monopotentes y células precursoras y maduras (Morrison et al, 1995). Estas poblaciones celulares pueden ser separadas mediante el uso de marcadores de superficie celular y cada etapa de diferenciación involucra pasos funcionalmente irreversibles (Weissman, 2000) (Figura 2).

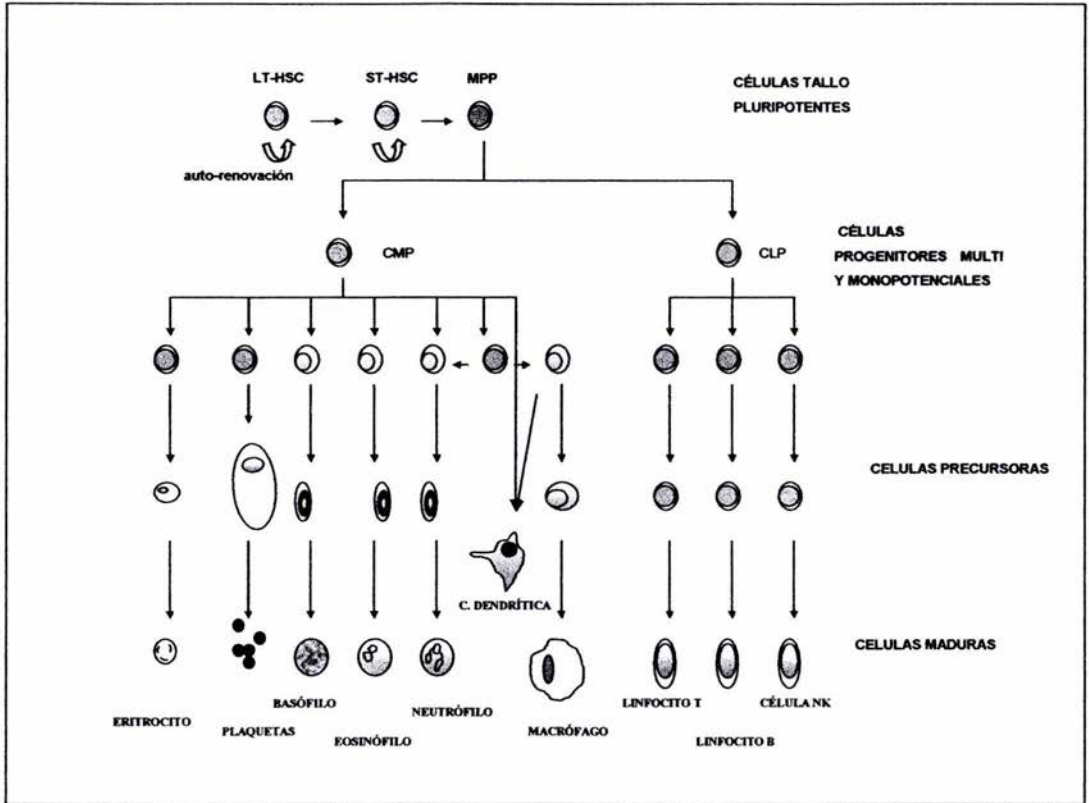


Figura 2. Modelo de la hematopoyesis. LT-HSC (Célula tallo hematopoyética reconstituyente a largo plazo), ST-HSCs (Célula tallo hematopoyética reconstituyente a corto plazo), MPP (Progenitores pluripotenciales), CMP (Progenitores comunes mieloeritroides), CLP (Progenitores comunes linfoides). Tomado y modificado de Weissman, 2000 y Kondo et al, 1997.

1) Células tallo pluripotentes

El compartimento de células tallo pluripotentes ha sido dividido en LT-HSC (CTH's-reconstituyentes a largo plazo, por su siglas en inglés, long-term hematopoietic stem cells), ST-HSC (CTH's-reconstituyentes a corto plazo, por su siglas en inglés, short-term hematopoietic stem cells) y MPP (Progenitores pluripotentes). Las pruebas a favor de la existencia de las LT-HSC son convincentes: a) ratones irradiados a los que se administran infusiones de células provista de marcadores cromosómicos generan células sanguíneas con el mismo marcador, b) tienen la capacidad de reconstituir la hematopoyesis durante toda la vida del huésped después de radio o quimioterapia (Morrison et al, 1995). Así mismo las LT-HSC constituyen una población con la capacidad de originar células progenitoras tanto del tipo linfoide como mieloide (son pluripotentes) (Morrison et al, 1995), y además estas células hematopoyéticas son capaces de autorrenovarse, es decir, pueden dar origen a células idénticas a ellas mismas.

Las ST-HSC son células semejantes a las LT-HSC presentes en médula ósea, las cuales pueden también autorrenovarse, así como generar todos los linajes sanguíneos, pero son definidas por su capacidad de restablecer la hematopoyesis sólo por algunas semanas (aproximadamente 8-10) en ratones que han sido previamente irradiados (Weissman, 2000).

El tercer tipo de células pluripotentes hematopoyéticas corresponden a los MPP los cuales ya no retienen la capacidad de autorrenovarse, pero dan origen directamente a todos los linajes sanguíneos; a través de dos tipos de células multipotentes: el progenitor común de linfocitos (CLP's) y el progenitor común mieloide (CMP's) (Weissman, 2000) (Figura 2).

2) Células Progenitoras Hematopoyéticas

La progenie de células pluripotentes incluye dos tipos de células oligolinajes-restringidos multipotentes: el CLP, células restringidas hacia linfocitos T, B y células NK, y CMP que a su vez origina progenitores mielomonocíticos (GMP's) y megacarioeritroides (MEP's). Estos progenitores derivan hacia unidades formadoras de colonias (UFC) de granulocitos (UFC-G), macrófagos (UFC-M), eritrocitos (UFC-E), megacariocitos (UFC-MK), linfocitos B (UFC-preB) y células dendríticas (UFC-DL). Las

células derivadas de estos progenitores (precursores) están lo suficientemente diferenciadas que pueden ser identificadas por morfología mediante técnicas de tinción y además existe una disminución progresiva en su capacidad proliferativa, debido a que han sufrido una especialización asociada a cambios con las fases de diferenciación y maduración (Bondurant and Koury , 1999).

Maduración linfocítica

La maduración de los precursores linfocíticos inicia con el linfoblasto. El cual tiene un diámetro aproximado de 10-20 μm con una relación núcleo-citoplasma elevada, el núcleo contiene cromatina en filigrana, pero aparece más densa que en los mieloblastos. Son visibles uno o dos nucleolos definidos en una tonalidad azul pálido, la membrana nuclear es densa y puede observarse una zona perinuclear clara, el estadio siguiente es el del prolinfocito, esta célula es muy difícil de distinguir; es algo menor que el linfoblasto y la proporción núcleo-citoplasma es baja, la cromatina es densa pero con una dispersión mas fina que la del linfocito, por lo general poseen nucleolos y el citoplasma es azul claro y agranular (Mckenzie, 2000).

Maduración eritroide

Gran parte del proceso de maduración de los precursores eritroides se aprecian morfológicamente; en particular el inicio de la síntesis de hemoglobina y la maduración y expulsión del núcleo. Cada proeritroblasto origina alrededor de ocho eritrocitos, el tiempo que transcurre desde la aparición del proeritroblasto hasta la aparición de los eritrocitos es de alrededor de cinco días. Es posible obtener un análisis cuantitativo de la evolución de los eritrocitos mediante el uso de hierro radioactivo inyectado vía intravenosa, el cual se acumula preferentemente en la ferritina recién sintetizada de los proeritroblastos y aparece por último en los eritrocitos en sangre periférica (Cecil et al, 1996).

Maduración granulocítica

El desarrollo de los neutrófilos se ha dividido en seis subtipos morfológicamente reconocibles: mieloblasto, promielocito, mielocito, meta-mielocito, neutrófilo en banda y neutrofilo segmentado. Su diferenciación está asociada con la reducción del volumen

nuclear, condensación progresiva de la cromatina, cambios en la forma del núcleo, la aparición secuencial de gránulos primarios (azurófilos) específicos (Jandl, 1991) y un aumento en la positividad a la tinción citoquímica cloroacetato esterasa, específica para el linaje granulocito-neutrófilo (Mckenzie, 2000; Ruiz, 2000).

Maduración Monocítica

El primer estadio en la diferenciación monocítica es el monoblasto, que corresponde a células de tamaño mediano, núcleo grande, con uno o dos nucleolos, indistinguibles de los blastos. La generación de promonocitos a partir de monoblastos va acompañado de cambios evidentes, siendo fácilmente reconocibles por su gran tamaño y cantidad de citoplasma, el núcleo indentado y de forma irregular. Del promonocito se originan monocitos, éstas son células relativamente grandes, con núcleos en forma de riñón, cromatina nuclear laxa y citoplasma abundante que contiene finos gránulos azurófilos. El estadio de monoblasto presenta una ligera positividad para la tinción acetato esterasa y al llegar a estadios de mayor madurez la reacción aumenta de manera notable, así como también la actividad enzimática, fagocitaria y la existencia de receptores para inmunoglobulinas y complemento; los gránulos que contienen peroxidasa son perdidos y aparecen lisozimas con actividades hidrolíticas (Stites, 1996; Jandl, 1991; William, 1991).

3) Células maduras

Las células hemáticas maduras circulantes son los productos de la maduración terminal de precursores; tienen una vida limitada, han perdido la capacidad de dividirse y han adquirido funciones biológicas específicas (Mckenzie, 2000).

Linfocitos

Los linfocitos maduros tienen una extrema variación en su tamaño que depende primariamente de la cantidad de citoplasma presente. Estas células se clasifican por lo general en linfocitos pequeños y grandes. El núcleo ocupa cerca del 90% del área celular, la cromatina está muy condensada y se tiñe de color púrpura y algunos linfocitos pueden mostrar gránulos azurófilos. Su función principal es la de mediar la inmunidad específica contra patógenos (Mckenzie, 2000; Stites, 1996).

Eritrocitos

Los eritrocitos presentes en sangre periférica corresponde a la última etapa de maduración de los proeritroblastos, su función principal es el transporte de oxígeno a los tejidos y la remoción del bióxido de carbono del cuerpo, manteniendo así un constante intercambio de gases en el organismo (Cecil et al, 1996).

Granulocitos

Los granulocitos se dividen en eosinófilos, basófilos y neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Los eosinófilos constituyen el 2-5% de los leucocitos sanguíneos en condiciones normales; su concentración en sangre aumenta enormemente en procesos alérgicos y parasitarios. Responden a agentes quimiotácticos y tienen cierta capacidad fagocítica. Los basófilos representa menos del 2% de los leucocitos sanguíneos tienen un papel importante en las reacciones alérgicas mediante la liberación de histamina y heparina. Mientras que los PMN, están asociados a la fagocitosis, muerte de patógenos bacterianos y representan un porcentaje elevado (90%) dentro de las células blancas circulantes en la sangre, tienen una breve existencia entre su formación en médula ósea y su subsiguiente actividad fagocitaria y microbicida (Toba et al, 1997; Dawson et al, 1994).

Monocito-macrófago

Los monocitos tienen un diámetro de 10-15 μm y poseen un núcleo irregular y un citoplasma finamente granular que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesqueleticos. Los monocitos representan un porcentaje del 1-6% del total de las células nucleadas presentes en sangre periférica. En el ratón tiene una vida media de 18 hrs. en la circulación y posteriormente migran a tejidos específicos transformándose en macrófagos. En el humano los monocitos duran de uno a tres días en circulación y posteriormente migran a tejidos, donde pueden vivir de semanas hasta años adoptando propiedades morfológicas y funcionales características del tejido en el cual residen. Dentro de las funciones principales de los monocitos se encuentran la fagocitosis de agentes patógenos, la presentación de antígenos y la secreción de varias citocinas (Zucker, 1988).

LÍNEAS CELULARES HEMATOPOYÉTICAS

El estudio de la hematopoyesis se ha facilitado gracias a la obtención de líneas hematopoyéticas multipotentes. Estas células pueden cultivarse por tiempo indefinido y mediante los estímulos adecuados tienen la capacidad de diferenciarse a varios linajes celulares. Su incapacidad de proliferar *in vitro* en ausencia de algún factor y la pérdida de tumorigenicidad *in vivo* apoyan fuertemente el argumento de que este tipo de líneas celulares son no malignas, y constituyen una valiosa herramienta para el estudio de la hematopoyesis normal. Las líneas de ratón FDCE-2, BSutA y 32D son algunos ejemplos de estas células (Humphires et al, 1981; Greenberger et al, 1983; Yoshikawa, 1996).

La línea celular 32 D, fue establecida por cultivos a largo plazo de médula ósea de ratón C3He/J inyectado con el virus de leucemia Murina Friend. Debido a que las células 32D son dependientes de interleucina-3 (IL-3) y además no inducen tumores cuando son transferidas a hospederos histocompatibles son consideradas como una población celular inmortalizada no maligna y ampliamente usada en el estudio de la hematopoyesis (Greenberger et al, 1983).

La línea mieloide 32D, puede ser diferenciada hacia granulocitos-neutrófilos en presencia de G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos), lo cual ha permitido que se estudien la expresión de genes involucrados en la diferenciación granulocítica (Morishita et al, 1992). También ha sido inducida hacia el linaje monocito-macrófago en respuesta al estímulo de GM-CSF (Kreider, 1990). Además, en un estudio reciente se observó que las células 32D se diferencian hacia el linaje monocito-macrófagos cuando son tratadas con caseínas (Ramos et al, 2000; Ramos et al, 2001).

REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

En el sistema hematopoyético, en condiciones normales, la mayoría de las células tallo se encuentran quiescentes –estado no proliferativo-, sin embargo, estas células pueden entrar en ciclo celular rápidamente al estar en contacto con una señal positiva. Por lo tanto, la generación de células sanguíneas dependerá del equilibrio entre señales estimuladoras e inhibitoras del medio (Morrison et al, 1995).

En el adulto la hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea dentro de un microambiente hematopoyético (MH) específico constituido por un componente celular y uno proteico que en conjunto proporcionan la mayoría de los factores requeridos para el desarrollo y crecimiento de las células sanguíneas (Flores, 2000).

Componente celular

El componente celular esta integrado por células del estroma y células accesorias. Dentro de las células del estroma encontramos: células reticulares, macrófagos, células endoteliales, adipositos y osteoblastos, los cuales están de manera permanente dentro del MH. Mientras tanto monocitos, linfocitos y células NK (natural killer, por sus siglas en inglés) solo se encuentran de manera transitoria en la médula ósea y son llamadas células accesorias. El componente celular produce y secreta diversos tipos de proteínas y además participa directamente en la regulación de la hematopoyesis mediante interacciones célula-célula (Flores, 2000).

Componente proteico

El componente proteico, lo integran moléculas de la matriz extracelular (ECM's) y las citocinas. Las moléculas de matriz extracelular son secretadas por las células del estroma medular y están constituidas por proteínas como la colágena, la fibronectina, la laminina, la hemonectina, la trombospondina y los proteoglicanos (Zuckerman, 1989). Estas moléculas proporcionan puntos de anclaje para la co-localización de células progenitoras y tallo hematopoyéticas, además los componentes estromales y las ECM's pueden directamente activar la proliferación, proteger de la apoptosis a las células hematopoyéticas o modular las respuestas a reguladores positivos o negativos de la hematopoyesis (Broxmeyer and Kim, 1999).

Citocinas

Las citocinas son los reguladores hematopoyéticos mejor caracterizados, y son producidas tanto por células accesorias como por células del estroma (Mayani, 1992). Las citocinas, son glicoproteínas que actúan por unión a receptores específicos, y activan una variedad de trayectorias de señalización. Estas agrupan a dos grandes grupos de proteínas denominadas: quimiocinas y factores de crecimiento hematopoyéticos, las cuales mediante las interacciones específicas ligando-receptor regulan la migración o retención, proliferación, diferenciación y destino de las células hematopoyéticas (Blanco, 2001; Wheton and Spooncer, 1998).

1) Quimiocinas

Las quimiocinas constituyen una gran familia de citocinas estructuralmente homólogas. Todas las quimiocinas son polipéptidos de bajo peso molecular conocidas también como citocinas quimiotácticas (Tabla 1). Se han identificado cerca de 50 quimiocinas diferentes y podría haber muchas más. Las quimiocinas se dividen en dos subfamilias principales según tengan los residuos de cisteína adyacentes en el extremo amino terminal (quimiocina CC) o separadas por un aminoácido (quimiocinas CXC). En una reacción inflamatoria, las quimiocinas CXC actúan principalmente sobre los neutrófilos y las quimiocinas CC actúan sobre los monocitos, linfocitos y eosinófilos (Abbas, 2002). En la hematopoyesis, las quimiocinas modulan el homing y el tráfico de células tallo y progenitoras hematopoyéticas; además, pueden afectar de manera negativa o positiva su proliferación (Broxmeyer and Kim, 1999).

FAMILIA	NOMBRE COMUN	CÉLULA BLANCO	FUNCIONES
CXC	IL-8	Neutrófilos	Inflamación aguda
	IL-8, Gro- α/β	Neutrófilos	Inflamación aguda
	IP-10, Mig (estimulada por IFG- γ)	Células T ($T_{H1}>T_{H2}$)	Migración de células T
	SDF-1	Células T, B, monocitos, neutrófilos, células tisulares	Reclutamiento de leucocitos (especialmente células T)
	BLC/BCA-1	células B, células T	Migración de células B a los folículos linfoides
C	Linfotactina/SCM1- α / SCM-1 β	Células T Células T	
CX3C	Fractalquina/Neurotactina	Células T, NK, monocitos	
CC	MIP-1 α , RANTES, MCP-2,3	Monocitos, basófilos, eosinófilos, células T	Inflamación
	Eotaxina, MPC-2,3,4, RANTES	Eosinófilos, basófilos, células T($T_{H2}>T_{H1}$)	Inflamación alérgica
	TARC	Células T($T_{H2}>T_{H1}$)	Tráfico de linfocitos
	RANTES, MIP-1 α , 1 β	MIP- Monocitos, células T($T_{H2}>T_{H1}$)	Inflamación, correceptor para el VIH
	LARC/MIP-3 α	Células, células B	Tráfico de linfocitos
	ELC	Monocitos, células dendríticas, células T vírgenes	Tráfico de linfocitos
	I309	Monocitos, células T	Tráfico de linfocitos

TABLA 1. QUIMIOCINAS: Familias, células blanco y funciones. Tomado y modificado de Abbas, 2000

2) Factores de Crecimiento Hematopoyético (FCH's)

Los factores de crecimiento hematopoyético (FCH's) son un grupo de polipéptidos solubles conocidos como citocinas hematopoyéticas, que regulan la producción de células hematopoyéticas maduras a partir de células progenitoras inmaduras presentes en la médula ósea. Actualmente se conocen más de 40 citocinas hematopoyéticas que incluyen: Factores de crecimiento hematopoyético, interleucinas (IL), interferones (IFN), etc. Los FCH's regulan la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de diferentes subpoblaciones hematopoyéticas (Clark, 1987; Metcalf, 1993). Además de su efecto en células progenitoras, estos factores también regulan propiedades funcionales en las células hematopoyéticas maduras (Soto, 1991) (Tabla 2).

Para que los FCH's ejerzan su actividad deben unirse a receptores específicos sobre las células blanco. La formación del complejo ligando-receptor trae como consecuencia una cascada de señales intracelulares a través de la activación de cinasas, dando como resultado final la activación celular (Linnekin, 1992). La unión inicial de las citocinas a sus receptores es un evento clave que ocurre rápidamente, en concentraciones muy bajas de citocinas, es prácticamente irreversible y da como resultado cambios intracelulares que conllevan a una respuesta biológica. El tipo de respuesta biológica puede variar entre los diferentes receptores para citocinas y de célula a célula, pero generalmente siempre implica la expresión génica, cambios en el ciclo celular y/o liberación de mediadores (Soto, 1999).

Familias	Moléculas	Células blanco principales
Factores de Crecimiento	Multi-CSF GM-CSF G-CSF M-CSF EPO SCF	Células progenitoras multipotenciales Macrófagos, neutrófilos y eosinófilos Neutrófilos Macrófagos Eritrocitos Progenitores mieloides y linfoides
Interleucinas	IL-1 IL-2 IL-3 IL-4 IL-5 IL-6 IL-7 IL-8 IL-9 IL-10 IL-11 IL-12 IL-13 IL-14 IL-15 IL-16 IL-17 IL-18	Linfocitos T y B Linfocitos T y activación de NK Células progenitoras multipotentes Linfocitos T y B Eosinófilos Megacariocitos, linfocitos T y B Precusores B y T, céls NK Activa neutrófilos y monocitos Linfocitos y eritrocitos Suprime actividad de macrófagos Células progenitoras hematopoyéticas Aumenta proliferación de células hematopoyéticas Linfocitos B Linfocitos B Linfocitos T Quimiotáctico y activación de linfocitos Estimula células estromales a producir citocinas Induce producción de IFN- γ en células T y NK
Interferones	IFN- α IFN- β IFN- γ	Actividad antitumoral y antiviral Activación de macrófagos
Factores de Necrosis Tumoral	TNF- α TNF- β	Efectos diversos en células epiteliales
Factores de crecimiento Transformante	TGF- α TGF- β	Fibroblastos y promueve angiogenesis Inhibidor de proliferación de varios tipos celulares
Factor inhibidor de leucemia	LIF	Células progenitoras dependientes de IL-3

Tabla 2. Citocinas que modulan la actividad biológica de las células hematopoyéticas. CSF, factor estimulador de colonias; M, macrófagos; G, granulocitos; SFC, factor de células tallo; BSGF, factor de crecimiento de células B; BSF, factor estimulador de células B; NCF, proteína activadora de macrófagos; EPO, entropoyetina; IL, interleucina.

Moléculas de naturaleza diferente a los FCH's que afectan la Hematopoyesis

Los FCH's son esenciales para la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, sin embargo se ha descrito que algunas moléculas de naturaleza diferente a los FCH's pueden tener algún tipo de efecto en células hematopoyéticas. Moléculas como el dimetil sulfóxido (DMSO), miristato de forbol (TPA), tetraóxido de arsénico y ácido retinoico (ATRA) entre otros, se han usado en estudios *in vitro* con líneas celulares hematopoyéticas. Siendo los más estudiados el ATRA y el tetraóxido de arsénico, los cuales presentan inhibición en la proliferación e inducen diferenciación de células leucémicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Takeda, 1982; Chen, 1996; Moore, 1991).

Además de los compuestos antes mencionados, se han efectuado diversos estudios con la caseína, la principal proteína de la leche (formada por las subunidades α_{s1} , α_{s2} , β y κ -caseína), concluyendo que las caseínas además de constituir una rica fuente de proteínas tienen importancia creciente como moduladores biológicos (Koletzco, 1998).

Caseína y hematopoyesis

En los años 70's se obtuvieron las primeras evidencias de los efectos biológicos de las caseínas, cuando se observó que la disminución de células hematopoyéticas de ratones privados de proteínas es recuperada al ser alimentados con una dieta rica en caseína (Aschkenasy, 1971; Okano et al, 1992), también se ha visto que la caseína al ser inyectada intraperitonealmente (I.P.) en ratones favorece la migración de neutrófilos y posteriormente macrófagos a la cavidad peritoneal de los ratones inyectados (Passoti et al, 1993), de igual manera se tienen reportes que la β -caseína tiene efectos en el sistema inmune, proporcionando efecto protector contra ciertas cepas de *Klebsiella pneumoniae* en ratones (Wong et al, 1996, Meisel, 1997). Así mismo, la α , β y κ -caseína reducen la proliferación e inducen la diferenciación de la línea hematopoyética mielóide 32D (Ramos et al, 2000) y reducen la proliferación de la línea leucémica mielomonocítica WEHI-3BD+ (Ramos, 2001). Por lo tanto las caseínas se postulan como candidatos a reguladores de actividades biológicas que incluyen células hematopoyéticas normales y malignas (Ramos et al. 2001).

Una serie de investigaciones realizadas durante los últimos años han propuesto que los responsables de la acción de algunas proteínas sean productos de su propia degradación. Aunque existen diversas proteínas de origen animal y vegetal que contienen secuencias potencialmente bioactivas, las proteínas de la leche son la principal fuente de un amplio número de péptidos biológicamente activos. Recientemente, se observó que ciertos fragmentos proteínicos (péptidos), derivados de las caseína presentan efectos biológicos. Estos péptidos, inactivos dentro de la secuencia de la proteína, pueden ser liberados mediante proteólisis enzimática tanto *in vitro* como *in vivo* y presentar actividades biológicas semejantes a hormonas (Meisel, 1997).

CASOMORFINAS

Las casomorfinas son un grupo de polipéptidos de cadenas cortas (3-10 aminoácidos) derivados de la α , β y κ -caseína (Meisel, 1997), que presentan un mecanismo de acción a través de receptores opioides similar a los ligandos opioides endógenos (encefalinas, endorfinas, dinórfinas). Las casomorfinas, son fragmentos de la secuencia 60-70 de la β -caseína y han sido caracterizadas como ligandos del receptor μ . Así mismo los péptidos derivados de la α -caseína o exorfinas, corresponden a fragmentos de la α_{s1} -caseína y son ligandos del receptor δ . Además de las caseínas otras proteínas de la leche como la α -lactoalbumina, β -lactoglobulina son fuente de otros ligandos opioides exógenos (Meisel and Bockelmann, 1999).

Presencia fisiológica

Durante la digestión *in vivo* de las proteínas, las enzimas proteolíticas gastrointestinales liberan péptidos, los cuales comúnmente son degradados a aminoácidos y éstos son absorbidos por la mucosa intestinal, sin embargo hay reportes de que algunos de estos péptidos son resistentes a la degradación enzimática, y son absorbidos, como es el caso del fragmento 60-66 de la β -caseína (1-7 β -casomorfina) que fue detectado en el intestino delgado después de la ingestión de leche en humanos adultos (Svedberg, 1985), y un precursor estable de este mismo péptido (Val-1-7 β -caseína) fue localizado en el intestino delgado y en la sangre de corderos después de haberse suministrado de forma oral (Read et al, 1990).

De igual manera un estudio llevado a cabo por Chabance B, con adultos humanos sanos demostró que, péptidos bioactivos son liberados en el estómago durante la digestión de leche o yogurt; y dos péptidos (uno derivado de la α_{s1} , y otro de la κ -caseína) con potencial actividad biológica pasaron a la sangre (Chabance, 1998); además, estudios *in vitro* han revelado que algunas enzimas gastrointestinales tienen la capacidad de generar varios péptidos de la β -caseína (Jinsmaa and Yoshikawa, 1999). Por lo tanto, es posible que algunos fragmentos de las proteínas sean parcialmente resistentes y puedan ser absorbidos en cantidades fisiológicamente activas y ejercer un efecto a nivel local en el tubo digestivo o bien a distancia en el organismo una vez que han ingresado al sistema circulatorio (Meisel and Bockelmann, 1999).

De forma análoga a lo que sucede durante el proceso de la digestión, en los productos industrializados derivados de la leche (quesos, yogurts, cremas, etc.) se han encontrado péptidos bioactivos, mismos que pueden ser generados por enzimas bacterianas lácticas (Muehlenkeamp and Warthesen, 1996)

Actividades biológicas

También se ha despertado el interés por descifrar los efectos biológicos de las casomorfina. Recientemente se ha observado *in vivo* un efecto antihipertensivo relacionado a varios péptidos originados de la α - y β - caseína (Yamamoto,1997), así mismo péptidos derivados de la κ -caseína son inhibidores de la agregación plaquetaria (Jolles, 1986), y la 1-5 β -casomorfina produce un efecto analgésico y un cambio conductual cuando es inyectada vía sistémica o intracerebroventricular (Elliot and Blom, 1996). También se ha detectado actividad antitumoral de estos péptidos, ya que existen reportes de su efecto antiproliferativo de líneas celulares de cáncer de seno (T47D, LNCaP) y de próstata (DU145 y PC3), en presencia de 90-95 y 90-96 α -casomorfina y de 1-5 y 1-7 β -casomorfina (Kampa,1996; Hatzoglu, 1996).

El análisis del papel de los péptidos funcionales en las defensas del organismo constituye un enfoque reciente y sumamente prometedor; y se sitúa en dos niveles: el efecto antimicrobiano y el efecto inmunomodulador; *in vitro*, se observa un efecto inhibidor del crecimiento de cepas patógenas en presencia de fragmentos de la α -caseína (Zucht et al,1995), *in vivo* algunos fragmentos de la β -caseína humana ejerce un efecto protector contra *Klebsiella pneumoniae* en ratones (Meisel, 1997). De igual manera se han realizado estudios para evaluar el efecto en células del sistema inmune y se ha reportado inmunoreactividad de linfocitos de sangre periférica (LSP) estimulada o suprimida por péptidos de β -caseína (Elitsur, 1991; Kayser and Meisel,1996). En células hematopoyéticas maduras se ha observado que afectan la respuesta proliferativa de linfocitos, la producción de radicales libres en neutrófilos y en macrófagos estimulan la fagocitosis de eritrocitos (Elitsur, 1991; Rabgaoui, 1994) (Tabla 3).

Secuencia peptídica	Fragmento	Nombre	Función biológica	Posible mecanismo de acción	Bibliografía
α_{s1}-caseína					
RYLGYLE	90-96	α -casein exorfina	Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides	Kampa et al, 1996 Hatzoglou et al, 1996
RYLGYL	90-95	α -casein exorfina	Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides	Kampa et al, 1996 Hatzoglou et al, 1996
FFVAP	23-27	α s1-casokinina-5	Antihipertensivo	Inhibidor de angiotensina	Yamamoto, 1997
FPEVFGK	28-34	α s1-casokinina-7	Antihipertensivo	Inhibidor de angiotensina	Yamamoto, 1997
TTMPLW	194-199	α s1-casokinina-6	Antihipertensivo	Inhibidor de angiotensina	Yamamoto, 1997
YVPXP	158-162	α s1-casomorfina	Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides	Kampa et al, 1996 Hatzoglou et al, 1996
β-caseína					
YFPFGPI	60-66	β -casomorfina-7	*Respuesta linfocitos *Hipoalgesia en ratas *Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides	Eltisur et al, 1991 Elliot and Blom, 1996 Kampa et al, 1996 Hatzoglou et al, 1996
YFPFG	60-64	β -casomorfina-5	Inhibe proliferación de células tumorales	Receptores opioides	Kampa et al, 1996 Hatzoglou et al, 1996
AVPYPQR	177-183	β -casokinina-7	Antihipertensivo	Inhibidor de angiotensina	Yamamoto, 1997
κ-caseína					
SRYPHY.OCH3	33-38	Casoxina-6	Antagonista opioide	Receptores opioides	Chiba et al, 1989
YIPIQYVLSR	25-34	Casoxina-C	Antagonista opioide	Receptores opioides	Chiba et al, 1989
MAIPPKKNQDK	106-116	Casoplateína	Actividad antitrombótica	Analogía estructural con fibrinogéno	Jolles et al, 1986

Tabla 3. Funciones biológicas de péptidos bioactivos. (—) no determinado. Tomado y modificado de Meisel, 1997.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hematopoyesis es un proceso complejo que involucra un sinnúmero de moléculas y mecanismos de acción que dan como resultado la generación, maduración y diferenciación de las células sanguíneas a partir de sus progenitores en médula ósea.

Para que este proceso se lleve a cabo se necesita la activación de señales producidas por moléculas conocidas como citocinas hematopoyéticas, las cuales son proporcionadas de manera endógena por el microambiente hematopoyético; sin embargo, durante las últimas décadas se han tenido reportes donde se involucran moléculas de naturaleza diferente a las citocinas hematopoyéticas, que presentan actividades semejantes a éstas, tal es el caso de la caseína (principal proteína de la leche) la cual puede generar monocitos a partir de una línea progenitora mieloide y afectar las funciones de algunas células hematopoyéticas maduras como los linfocitos, monocitos y neutrófilos.

Una serie de investigaciones recientes proponen que los responsables de la acción de moléculas como la caseína, sean productos de su propia degradación, pues varios autores han descrito péptidos biológicamente activos provenientes de la caseína conocidos como casomorfina, las cuales presentan efectos importantes en líneas celulares de cáncer de seno y próstata, así como también en células hematopoyéticas maduras.

Es indiscutible la participación de las casomorfina en diversos procesos fisiológicos, sin embargo aún falta dilucidar aspectos importantes del papel biológico que juegan estas moléculas dentro de procesos tan importantes como es la hematopoyesis; por lo que el presente trabajo evaluó el efecto de las casomorfina sobre la línea hematopoyética mieloide multipotencial 32D, tomando esta línea celular como modelo de la hematopoyesis normal, se evaluaron parámetros esenciales de la hematopoyesis.

OBJETIVO GENERAL

- DETERMINAR EL EFECTO DE LA 1-5 β -CASOMORFINA, 1-7 β -CASOMORFINA y 90-95 α -CASOMORFINA EN LA PROLIFERACION Y DIFERENCIACION DE LA LINEA MULTIPOTENCIAL MIELOIDE 32D.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar la proliferación de la línea celular 32D en presencia de 1-5 β -casomorfina, 1-7 β -casomorfina y 90-95 α -casomorfina
- Determinar si las casomorfinas empleadas afectan la viabilidad de la línea celular 32D
- Analizar si alguna de las casomorfinas promueve la diferenciación de la línea celular 32D

HIPÓTESIS

Las caseínas afectan a células hematopoyéticas maduras tanto *in vitro* como *in vivo*. Recientemente observamos que reducen la proliferación e inducen diferenciación monocítica y granulocítica de las células progenitoras mieloides 32D. Sumado, a ésto, se ha reportado que péptidos derivados de las caseínas conocidos como casomorfina, además de presentar otras actividades biológicas afectan a células hematopoyéticas maduras (macrófagos, neutrófilos y linfocitos). Por lo tanto, es posible que las casomorfina afecten a las células 32D induciendo diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago y/o granulocito-neutrófilo.

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

SFB (Suero fetal bovino, HyClone UTA, USA).

MIMD (Medio Iscove's Modified Duldecco's, Gibco BRL, USA).

rmIL-3 (Interleucina-3 recombinante de ratón, R&D System, USA).

Casomorfina (1-5 y 1-7 β -casomorfina, 90-95 α -casomorfina, Sigma Chemical St. Louis Mo, USA).

Los reactivos que no indican proveedor, fueron proporcionados por SIGMA Chemical St. Louis Mo USA a excepción del agua destilada y PBS (Amortiguador de fosfatos).

LÍNEA CELULAR

La línea mielóide multipotencial 32D se cultivó en una atmósfera al 5% de CO₂ y 37°C, en cajas Petri (Fisher Brand, Denmark) empleando MIMD, suplementado con 10% de SFB y 0.5 ng/ml de rmIL-3. Las células 32D fueron mantenidas a una densidad inicial de 1x10⁵ células/ml y resembradas cada 48 horas.

CULTIVOS EN PRESENCIA DE CASOMORFINAS

Las casomorfina (1-5 β -casomorfina, 1-7 β -casomorfina y 90-95 α -casomorfina) se solubilizaron en PBS a una concentración de 10 mM, de estas soluciones se realizaron diluciones en PBS para llegar a las concentraciones de cultivo deseadas.

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning NY, USA) a una densidad inicial de 2x10⁴ células/ml en las condiciones ya descritas; al inicio del cultivo se adicionaron las casomorfina o PBS como control del vehículo. Los cultivos fueron evaluados transcurridas 96 hrs.

PROLIFERACIÓN CELULAR

Después de transcurrido el tiempo indicado para cada ensayo; los cultivos celulares fueron resuspendidos, una alícuota se colocó en un hemocitómetro y con la ayuda de un microscopio de luz (Carl Zeiss) se evaluó el número celular para el posterior cálculo de la densidad celular. $\text{Densidad celular} = (\text{Células Contadas} \times 10,000) = \text{cells/mL}$.

VIABILIDAD

Para determinar la existencia de muerte por necrosis se empleó el método de exclusión del colorante Azul Tripano. Brevemente, una muestra de las células cultivadas fue mezclada en proporción 1:1 con el colorante, se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente, una alícuota fue colocada en un hemocitómetro y se procedió a evaluar la diferencia entre células muertas (teñidas por el colorante) y vivas (Freshney, 1994).

DIFERENCIACIÓN CELULAR

La diferenciación morfológica se evaluó después de realizar un frotis y teñir con el colorante Giemsa identificando las células blásticas y los linajes monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo por su tamaño, forma del núcleo y la proporción núcleo-citoplasma.

Además para identificar con mayor precisión los linajes celulares, se realizaron técnicas de tinción citoquímica específicas para el linaje monocito-macrófago (α -naftil acetato esterasa) y para el granulocito-neutrófilo (cloroacetato esterasa) (Sun et al, 1985).

Tinción de Giemsa.

Reactivos

1. Solución Patrón
Disolver 50 mg de Giemsa en 5 ml de metanol (cubrir de la luz).
2. Solución de Tinción (preparar al momento de la tinción).
Tomar 1 ml de la solución patrón y diluir con 9 ml de H₂O destilada.

Procedimiento

1. Preparación de la muestra. Tomar una alícuota de la muestra de cultivo (30-40 μ l) y colocarla en la camisa para centrifuga (Shandon Southern cytospin), colocar el portaobjetos y centrifugar por 3 min. Dejar secar.
2. Fijar la muestra por 3 min. con metanol. Dejar secar.
3. Teñir con la solución de tinción de 10 a 15 min., lavar a chorro de agua. Dejar secar.

Observar la morfología bajo el microscopio (40X y 100X), contando mínimo 200 células y distinguir las células diferenciadas de los blastos.

Blasto

Núcleo redondo ligeramente oval

Citoplasma no granuloso y de color azulado

Célula redonda o con algunas prolongaciones (pequeñas)

Célula relativamente pequeña parecida al neutrófilo

Relación núcleo/citoplasma alta, casi todo el espacio es ocupada por el núcleo

Promonocito

Núcleo generalmente redondo o reniforme

El núcleo puede presentar circunvoluciones (aspecto de cerebro)

El citoplasma puede presentar pseudópodos

Citoplasma gris-azulado, más claro que blastos y de granulocitos

Vacuolas digestivas

Relación núcleo/citoplasma menor (presenta gran cantidad de citoplasma)

Monocito

El monocito tiene las mismas características del promonocito, pero más pronunciadas

Neutrófilo polimorfonuclear (PMN)

Núcleo separado en lóbulos

Gránulos

(Diggs, 1971; Cartwright, 1973; McDonald, 1998)

Tinción α -naftil acetato esterasa.

La tinción α -naftil acetato esterasa es útil para identificar células del linaje monocito-macrófago, ésta se realizó utilizando como control positivo a la línea celular de tipo monocito-macrófago P388.

Las esterazas son enzimas capaces de hidrolizar a los ésteres alifáticos y aromáticos, liberando naftol, el cual se acopla a un colorante diazonio, para generar un azocolorante insoluble. Los substratos acetato de alfa-naftilo son hidrolisados por las esterazas de los monocitos, produciendo un precipitado color marrón en el citoplasma celular. La intensidad de reacción aumenta conforme la célula va diferenciándose.

Reactivos

1. α -naftil acetato
2. Solución fijadora (estable por dos meses a 4°C)
3. Disolver acetato de sodio (60 mg) en acetona (60 ml), adicionar agua destilada (40ml) y ácido acético (70 μ l)
4. Solución de Pararosnilina (estable por dos meses a 4 °C)
5. Disolver Pararosnilina (1g) en HCl 2N (25 ml) realizarlo en caliente (baño maría)
6. Filtrar cuando este a temperatura ambiente
7. Solución de nitrito de sodio. Disolver nitrito de sodio (1 g) en agua destilada (25ml)
8. Solución de fosfatos 0.2 M pH 7.0-7.1
14.196 g de Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico) en agua destilada (500 ml) (A)
11.9 g de NaH_2PO_4 monohidratado (fosfato de sodio ácido) en agua destilada (500 ml) (B)

9. Mezclar 130 ml de la solución A con 250 ml de la solución B

10. Hematoxilina de Meyer

11. Solución salina. NaCl al 0.9 % (p / v)

Procedimiento

1. Tomar una alícuota de la muestra de cultivo (30-40 μ l) y colocarla en la camisa para centrífuga (Shandon Southern cytospin), colocar el porta-objetos y centrifugar por 3 min. Dejar secar
2. Dejar un minuto los extendidos en solución fijadora
3. Lavar con solución salina. Dejar secar
4. Incubar los frotis durante 60 min. en la siguiente solución:
 - a) 50 μ l de la solución de nitrito de sodio y 50 μ l de solución de Pararosanilina
Mezclar las soluciones durante 1 min. y adicionar 5 ml de solución de fosfatos 0.2M
 - b) Diluir 10 mg de α -naftil acetato en 0.2-0.3 ml de acetona, después agregar agitando 20 ml de la solución de fosfatos
5. Las dos soluciones se mezclan y se filtran
6. Después de transcurrido el tiempo indicado se lavan los frotis con agua destilada
7. Una vez secos los frotis se les adiciona Hematoxilina de Meyer por un periodo de 10-30 min.
Posteriormente se lavan con agua destilada y se dejan secar

(Las células positivas se observan con un precipitado color marrón en el citoplasma)

Tinción de cloroacetato esterasa

La tinción de cloroacetato esterasa es útil para identificar células del linaje granulocito-neutrófilo, se realizó utilizando como control positivo células de médula ósea de ratón CD-1.

Las esterasas de los granulocitos-neutrófilos liberan al naftol del sustrato, cloroacetato de naftol AS-D el cual precipita, produciendo finos gránulos rojos brillantes en el citoplasma celular. La intensidad de la reacción es proporcional a la maduración celular.

Reactivos

1.- Naftol- AS-D Cloroacetato (estable por dos meses a 4°C)

2.- Solución fijadora (estable por dos meses a 4°C)

Disolver Na_2HPO_4 (20 mg), KH_2PO_4 (100 mg) en agua destilada (30ml), adicionar acetona (45 ml) y formaldehído (25 ml), llevar la solución a pH 6.6

3.- Solución de Fuccina nueva (estable por dos meses a 4°C)

Disolver Fuccina nueva (1g) en HCl 2N (25 ml) realizarlo en caliente (baño maria)
Filtrar cuando este a temperatura ambiente

4.- Solución de nitrito de sodio. Disolver nitrito de sodio (1 g) en agua destilada (25ml)

5.- Solución de fosfatos pH 7.73

a) 0.852 g de NaH_2PO_4 y 0.09 g KH_2PO_4 en agua destilada (100 ml)

6.- Hematoxilina de Meyer

7.- Solución salina. NaCl al 0.9 % (p / v)

Procedimiento

- 1.-Tomar una alícuota de la muestra de cultivo (30-40 μ l) y colocarla en la camisa para centrifuga (Shandon Southern cytospin), colocar el porta-objetos y centrifugar por 3 minutos. Dejar secar

- 2.- Colocar los extendidos durante 30 seg. en solución fijadora
Transcurrido el tiempo lavar con solución salina

- 3.- Incubar los frotis durante 30 min. con la siguiente solución
 - a) 50 μ l de la solución de nitrito de sodio con 50 μ l de la solución de Fuccina nueva
Mezclar perfectamente las dos soluciones durante un minuto y adicionar 9.5 ml de la solución de fosfatos pH 7.73
 - b) Agregar 0.5 ml de la solución de AS-D Cloroacetato y mezclar perfectamente
Una vez concluido el periodo de incubación lavar los frotis con agua destilada

- 4.- Teñir los frotis de 10-30 min. con Hematoxilina de Meyer
Transcurrido el tiempo lavar con agua destilada.

(Las células positivas se observan con gránulos rojos brillantes en el citoplasma)

Varios

Todos los experimentos fueron realizados cuando menos tres veces de manera independiente. Los ensayos de conteo directo y viabilidad fueron realizados por triplicado, mientras que los ensayos de morfología se realizaron por duplicado. A los resultados que así lo indican se les realizó una prueba análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey, se expresa una $P < 0.05$ (respecto al cultivo con solo vehículo) y su desviación estándar (D.S.)

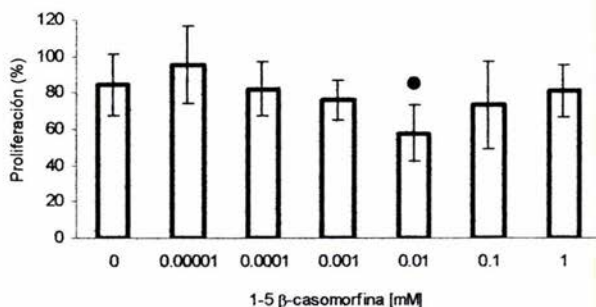
Los demás resultados son expresados con la media y su desviación estándar. En los ensayos de diferenciación (morfológicos y citoquímicos) se contaron al menos 200 células por preparación.

RESULTADOS

PROLIFERACIÓN DE LA LINEA CELULAR 32D EN PRESENCIA DE 1-5 β -CASOMORFINA, 1-7 β -CASOMORFINA Y 90-95 α -CASOMORFINA

Una característica de las células hematopoyéticas progenitoras es su alto índice de proliferación el cual disminuye conforme se diferencian hacia células sanguíneas maduras (Lee, 1998). Para determinar el efecto en la proliferación de las células 32D en presencia de las casomorfina se realizaron ensayos dosis-respuesta, incubando las células 32D por 96 horas en sus condiciones normales de cultivo (10% de SFB y 0.5 ng/mL de IL-3) a una densidad inicial de 20, 000 cels/ml.

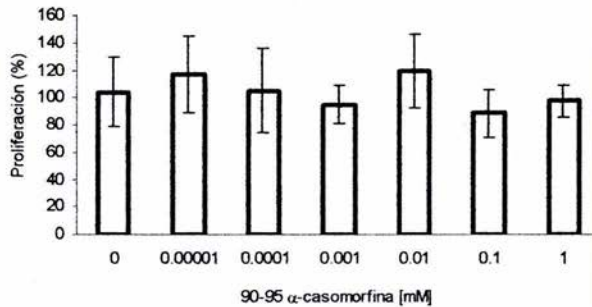
Transcurrido el periodo de incubación se evaluó la proliferación. Se observó que sólo la dosis de 0.01 mM de 1-5 β -casomorfina disminuyó de manera significativa la proliferación con respecto al control. Mientras que el efecto de dosis menores o mayores no alteró de manera significativa la proliferación (Gráfica 1).



Gráfica 1. Efecto de la 1-5 β -casomorfina en la proliferación de células 32D. Las células 32D fueron expuestas a diferentes concentraciones por un periodo de 96 hrs. Se expresan promedios del % de proliferación y su D.S.

- Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control [0 mM] 0=Control

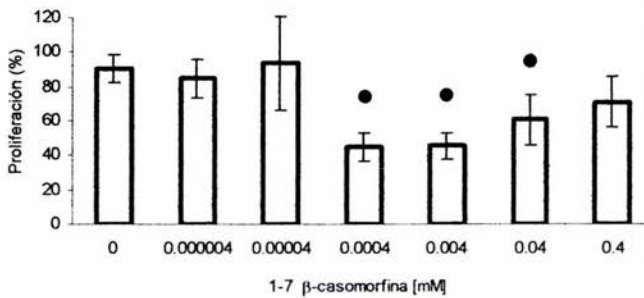
A pesar de emplear dosis cercanas o mayores a las reportadas en la literatura en las que 90-95 α -casomorfina presenta actividad en líneas celulares de cáncer (Hatzoglu, 1996), esta casomorfina no alteró la proliferación de las células 32D, puesto que con ninguna de las dosis utilizadas se vió un aumento o una disminución significativa en la proliferación con respecto al control (Gráfica 2).



Gráfica 2. Efecto de la 90-95 α -casomorfina en la proliferación de células 32D. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones por un periodo de 96 hrs. Se expresan % de proliferación y su D.S.

- Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control[0 mM]

En lo que respecta al efecto de 1-7 β -casomorfina en la proliferación de las células 32D, se observó una reducción de la proliferación del 46% a una concentración de 0.0004 mM con respecto al control (Gráfica 3), esta disminución fue compartida aunque en menor medida con las dosis 0.004 y 0.04 mM. Mientras que las dosis restantes no presentaron un efecto significativo en la proliferación, aún con la dosis más alta de 0.4 mM.



Gráfica 3. Efecto de la 1-7 β -casomorfina en la proliferación de células 32D. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones por un periodo de 96 hrs. Se expresan % de proliferación y su D.S.

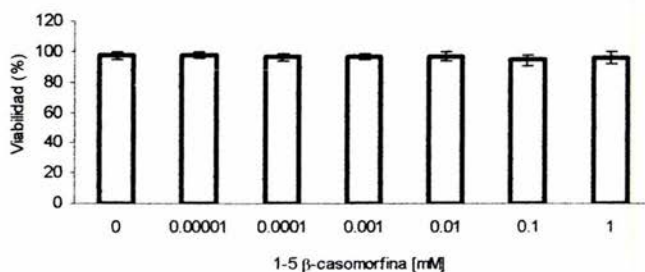
• Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control [0 mM]

EFFECTO DE LAS CASOMORFINAS SOBRE LA VIABILIDAD DE LA LINEA CELULAR 32D

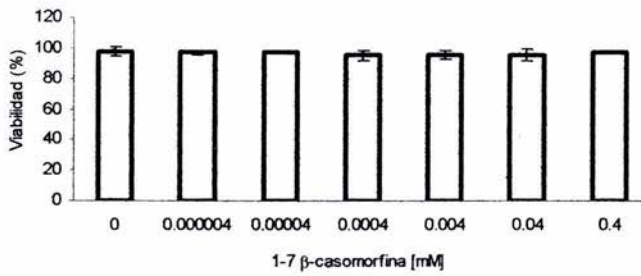
Para descartar que la disminución en la proliferación de las células 32D en presencia de 1-5 β -casomorfina y 1-7 β -casomorfina sea consecuencia de toxicidad, se realizaron ensayos de exclusión al azul tripano para evaluar la viabilidad. Esta prueba permite diferenciar a las células vivas de las células muertas, debido a que la membrana de las células en necrosis se encuentra dañada y permite la entrada del colorante.

En general, se obtuvo un comportamiento homogéneo, indicando que ninguna de las casomorfinas alteró de manera significativa la viabilidad de las células 32D con respecto a los controles. Es más, la viabilidad siempre se mantuvo en un porcentaje del 95% (+/-2), tanto en presencia de las casomorfinas que disminuyeron la proliferación (Gráfica 4 A y B) así como con la 90-95 α -casomorfina (Gráfica 4 C).

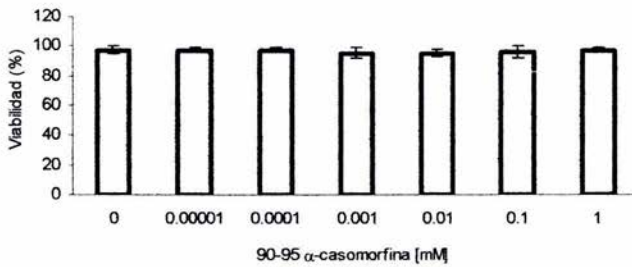
GRÁFICA 4 A



GRÁFICA 4 B



GRÁFICA 4 C



Gráfica 4. Efecto de A) 1-5 β -casomorfina, B) 1-7 β -casomorfina y C) 90-95 α -casomorfina en la viabilidad de células 32D. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones por un periodo de 96 hrs. Se expresa % de viabilidad y su D.S. con respecto al control [0 mM]

EFFECTO EN LA DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR 32D MEDIADO POR LAS CASOMORFINAS

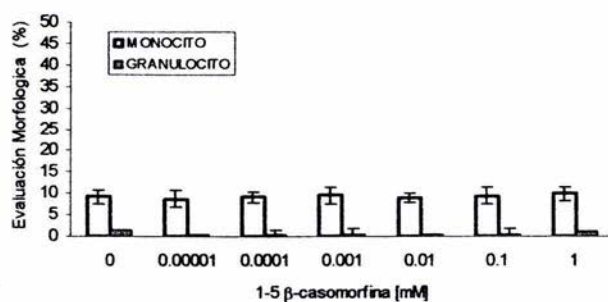
Una característica de la diferenciación que sufren las células hematopoyéticas es un cambio evidente en el tamaño de la célula, el tamaño y forma del núcleo y la relación núcleo/citoplasma. Para evaluar, si existía diferenciación de las células 32D con los diferentes tratamientos, primeramente se determinó si había algún cambio morfológico, mediante tinciones con Giemsa. En los cultivos sin estímulo el porcentaje de células con características del linaje monocito-macrófago y del linaje granulocito-neutrófilo fueron menores al 2% (Foto 1A), por lo que cerca de un 90 % de las células 32D presentan una morfología blástica.

Por lo que respecta al tratamiento con 1-5 β -casomorfina las células 32D se observó que el porcentaje de células que presentaron las características del linaje monocito-macrófago, fueron del 9% (+/-0.5) para todas las dosis incluyendo la que presento un efecto significativo en la disminución de la proliferación (0.01 mM) (Foto 1 B). Así mismo las células del linaje granulocito-neutrófilo que se generaron a partir del estímulo con la 1-5 β -casomorfina fueron semejantes a los que se observaron en las células con vehículo (Gráfica 5).

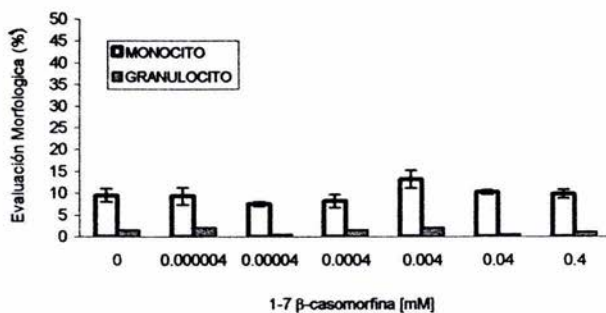
Los resultados derivados de la estimulación de las células 32D con la 1-7 β -casomorfina mostraron que el porcentaje de células del linaje monocito-macrófago y del granulocito-neutrófilo fue muy similar al control aun con la dosis de 0.004 mM (Gráfica 6) (Foto 1C).

Al igual que con las otras casomorfina la 90-95 α -casomorfina no provocó un cambio en la morfología de las células 32D (Gráfica 7). Se utilizó como control positivo células 32D tratadas con β -caseína (Foto 1D).

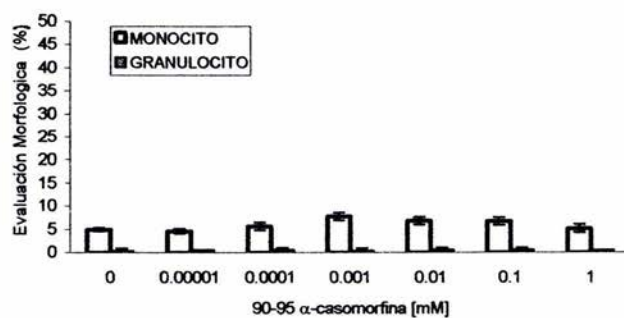
GRÁFICA 5



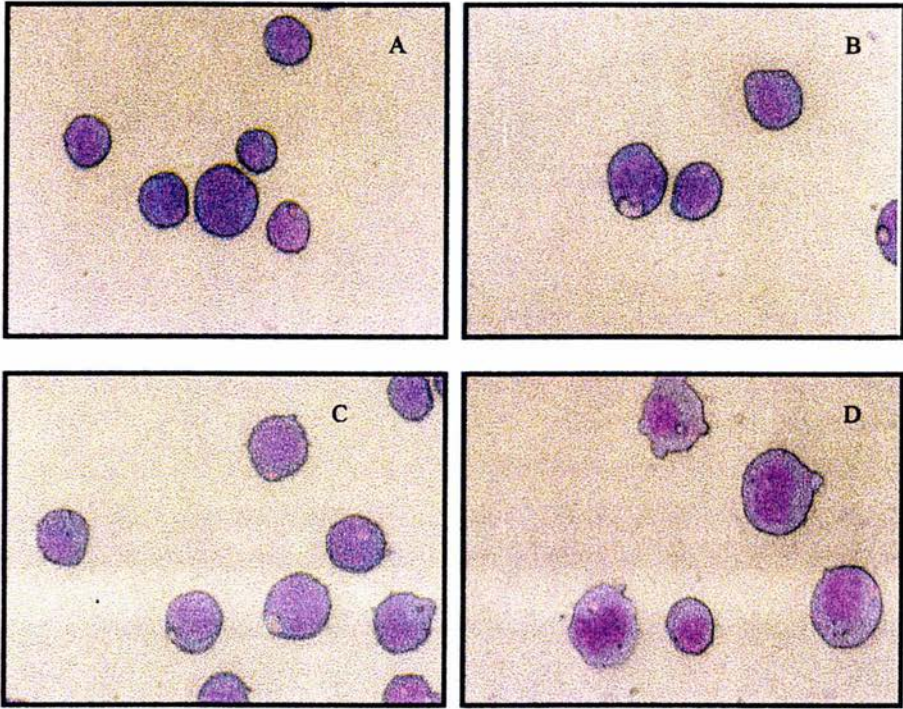
GRÁFICA 6



GRÁFICA 7



Gráfica 5, 6 y 7. Efecto de la 1-5, 1-7 β -casomorfina y 90-95 α -casomorfina en la diferenciación de células 32D mediante técnica de Giemsa. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones por un periodo de 96 hrs. Se expresan % de células de cada linaje y su D.S.



Fotografía 1. Morfología de las células 32D en presencia de casomorfina (400X). Las células 32D fueron cultivadas por 96 hrs con A) sólo vehículo, B) en presencia de 1-5 β -casomorfina, C) 1-7 β -casomorfina y D) β -caseína. La morfología fue determinada mediante tinciones con el colorante Giemsa.

Para realizar una evaluación más precisa de las células 32D tratadas con casomorfina, se realizaron tinciones citoquímicas específicas (α -naftil acetato esterasa) para el linaje monocito-macrófago utilizando como control positivo la línea macrofagica P-388, en donde se observó un precipitado color marrón (células positivas) característico de este linaje (Foto 2 A)

Las células 32D con sólo vehículo presentaron porcentajes cercanos a 1.5 % de células positivas (Foto 2 B). En presencia de 1-5 y 1-7 β -casomorfina, el porcentaje de células del linaje monocito-macrófago fue muy cercano al control para todas las concentraciones (Foto 2 C). Mientras que el efecto de la 90-95 α -casomorfina fue también semejante al obtenido en el cultivo con sólo PBS. En la foto 2 D se muestra un comparativo con β -caseína.

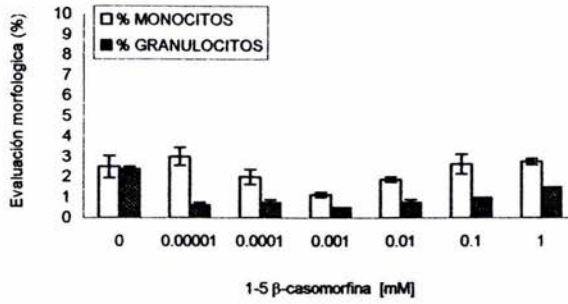
En la caracterización para el linaje granulocito-neutrófilo, se utilizó la tinción de cloro acetato esterasa empleando como control positivo células de médula ósea de ratón CD-1 donde existen células granulocíticas en varias etapas de diferenciación (Foto 1 E). El control positivo de la tinción mostró la presencia de gránulos rojos en el citoplasma (células positivas) característicos de este linaje. El número de células positivas encontradas en el control (0.0 mM) fue menor del 1% (Foto 1F), y este porcentaje fue compartido de manera homogénea por 1-5, 1-7 β -casomorfina y 90-90 α -casomorfina a las diferentes dosis (Gráfica 8-10)

De acuerdo a los resultados obtenidos con las tinciones morfológicas citoquímicas específicas y comparándolas con los datos obtenidos en el laboratorio para las células 32D en presencia de α y β -caseína (Tabla 4), pudimos observar que las casomorfina no propiciaron diferenciación de la línea mieloide 32D con ninguna de las dosis utilizadas.

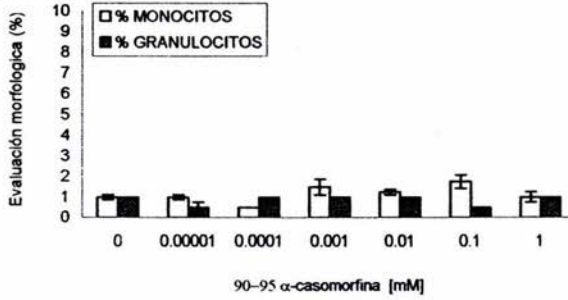
TRATAMIENTO	MORFOLOGIA		CITOQUIMICA	
	GRANULOCITO NEUTROFILO	MONOCITO MACROFÁGO	GRANULOCITO NEUTROFILO	MONOCITO MACROFÁGO
0.0 mM	2.6 +/- 1.5	5.1 +/- 1.9	1.29 +/- 0.2	3.8 +/- 1.1
α -caseína mM	6.6 +/- 1.3	22.8 +/- 1.7	0.9 +/- 0.3	26.9 +/- 17.1
β -caseína mM	9.3 +/- 1.5	37.0 +/- 9.5	1.03 +/- 0.5	19.6 +/- 10.8

Tabla 4. Diferenciación de las células 32D en presencia de α y β -caseína. Las células 32D fueron cultivadas por periodos de 96 hrs a una densidad inicial de 2×10^4 cels/ml. Se evaluó la morfología mediante tinciones con Giemsa y se realizaron tinciones citoquímicas específicas para el linaje granulocito-neutrofilo (cloroacetato esterasa) y para el linaje monocito-macrófago (α -naftil acetato esterasa). Tomado de Ramos, 2004.

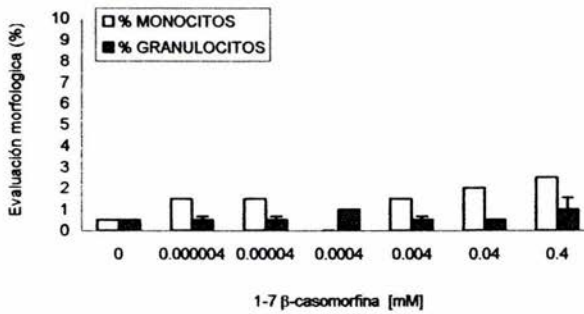
GRÁFICA 8



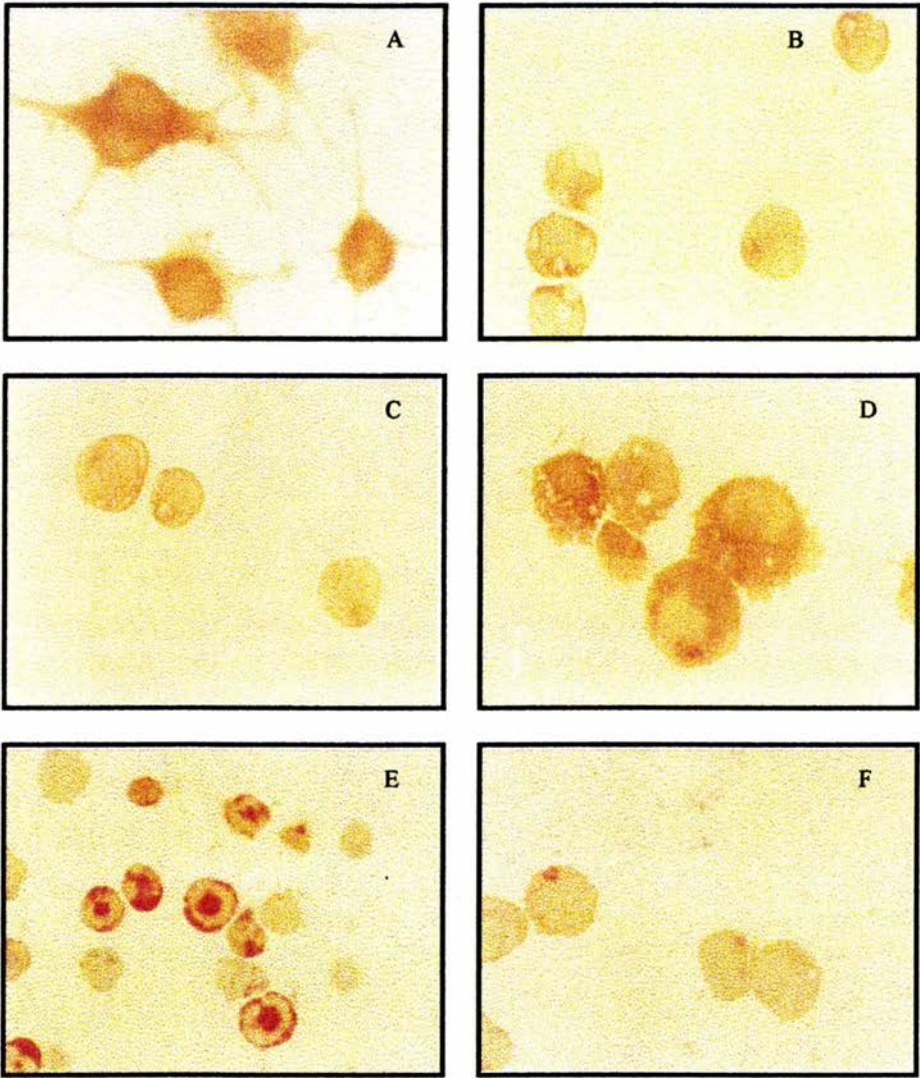
GRÁFICA 9



GRÁFICA 10



Gráfica 9, 10 y 11. Efecto casomorfinas en la diferenciación de células 32D mediante tinción citoquímica para el linaje monocito-macrófago y granulocito. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones por un periodo de 96 hrs. Se expresan % de células positivas y su D.S.



Fotografía 2. Tinciones citoquímicas (400X). Linaje monocito macrófago, tinción α -naftil acetato esterasa; A) línea monocítica P-388, B) células 32D con vehículo, C) células 32D en presencia de 1-7 β -casomorfina, D) células 32D en presencia de β -caseína. Linaje granulocito-neutrófilo, tinción cloroacetato esterasa; E) células de médula ósea, F) células 32D con vehículo.

ANALISIS DE RESULTADOS

La caseína está constituida por subunidades denominadas α , β y κ -caseínas, las cuales presentan efectos sobre el sistema inmunológico y células progenitoras hematopoyéticas (Wong et al, 1996; Ramos et al, 2001). Cuando las caseínas son sometidas a procesos enzimáticos tanto *in vivo* como *in vitro* pueden generar péptidos con actividades biológicas (Meisel, 1997), algunos de estos péptidos bioactivos derivados principalmente de α y β -caseínas son denominados casomorfina (Meisel and Bookelman 1999).

Las casomorfina presentan una amplia variedad de actividades, en condiciones *in vivo* afectan al sistema inmunológico, sistema nervioso y sistema hemostático, además de presentar efectos antihipertensivos (Kampa et al, 1996; Yamamoto, 1997; Elitsur et al, 1991; Jolles et al, 1986). *In vitro* las casomorfina ejercen efectos sobre células hematopoyéticas maduras como: linfocitos, neutrófilos PMN y monocitos-macrófagos (Elitsur et al, 1991; Rabagoui et al, 1994).

Las actividades de las casomorfina y en diversas funciones fisiológicas nos ha despertado el interés de descifrar sus efectos sobre la hematopoyesis, para lo cual determinamos si estas moléculas son capaces de ejercer algún tipo de efecto sobre la proliferación, la diferenciación y la sobrevivencia de células progenitoras. Para lograr nuestro objetivo empleamos la línea celular progenitora mieloide 32D; la cual ha demostrado ser una valiosa herramienta para la investigación de la hematopoyesis normal (Greenberger et al, 1983).

Las células 32D cuando son expuestas a moléculas que favorecen su diferenciación hacia monocitos-macrófagos y granulocitos, presentan periodos de respuesta variables entre 4 días con α y β -caseína (Ramos et al, 2000) y de 7 días para GM-CSF y G-CSF (Kreider et al, 1990; Valtieri et al, 1987) aproximadamente. Basándonos en lo anterior, evaluamos el efecto de las casomorfina sobre la proliferación de las células 32D, por periodos de cuatro días. Encontramos que la 1-5 β -casomorfina sólo a la concentración de 1×10^{-5} M provocó una disminución significativa del 38%; mientras que la 1-7 β -casomorfina tuvo concentraciones que fluctuaron entre 4×10^{-6} M y 4×10^{-8} M para tener un efecto significativo, presentando un porcentaje de inhibición del 47 %, mientras que la 90-95 α -casomorfina no presentó efecto sobre la

proliferación celular de la línea 32D. Las dosis de 1-5 y 1-7 β -casomorfina que presentaron efectos sobre la proliferación fueron semejantes a las que reporta Elitsur (1×10^{-6} M) en células hematopoyéticas maduras (linfocitos).

El efecto producido por las casomorfinas sobre la proliferación no afectó la viabilidad de las células; ya que ésta siempre se mantuvo por encima del 90 %, este resultado es semejante a los observados con linfocitos de la lamina propia (Elitsur et al 1991) y las mismas células 32D en presencia de α y β -caseína (Ramos et al, 2000), lo que indica que estas moléculas no son tóxicas para las células hematopoyéticas tanto progenitoras como maduras. Una vez establecido que el efecto de las casomorfinas no era debido a un efecto de toxicidad, queda por establecer, que provoca la disminución proliferativa, reportes previos establecen que la reducción en la proliferación implica una reducción en alguna de las fases del ciclo celular, lo cual es un indicativo de que las células se encuentran en cierta etapa de diferenciación (metamielocitos, promonocitos), o que se han diferenciado completamente (Zucker et al, 1988; Brietman et al, 1994).

Las células 32D en su condición de células progenitoras responden a diversos estímulos que favorecen su diferenciación hacia linajes mieloides, tal es el caso del G-CSF (Valtieri, et al, 1987), y el GM-CSF (Kreider et al, 1990). Además en el laboratorio se han dado las primeras evidencias de que las células 32D en presencia de las caseínas tienden a inclinarse hacia una diferenciación del linaje monocito-macrófago (Ramos, 2000); por lo cual se esperaba que las casomorfinas por ser derivados de las mismas caseínas presentaran un comportamiento semejante, sin embargo los resultados obtenidos mostraron que las casomorfinas no condujeron a las células 32D a un estado de diferenciación, ya que el porcentaje de células positivas fue muy cercano al cultivo para el linaje monocito-macrófago y para el linaje granulocito-neutrófilo; este efecto fue compartido por las tres casomorfinas, lo que nos hace hipotetizar que el efecto sólo se está presentado de manera parcial; provocando que las células 32D reduzcan su índice de proliferación, pero no se induce su diferenciación como ocurre comúnmente en el proceso de hematopoyesis (Goo and Hay 1999; Smith 2003).

Estos resultados nos presentan evidencias de que las casomorfinas sí están afectando la hematopoyesis, y que este efecto se presenta sobre la proliferación sin alterar la viabilidad de dichas células, con dosis semejantes o menores a las utilizadas

con células hematopoyéticas maduras. Es interesante observar que las casomorfina se postulan como nuevas moléculas con acciones *in vitro* sobre células hematopoyéticas progenitoras y abre un campo de investigaciones de nuevas moléculas de origen exógeno y naturaleza diferente a los FH's, e involucra a su vez nuevos y diferentes mecanismos de acción. Aunque los mecanismos de acción de las casomorfina aun no están completamente dilucidados; existen algunos reportes que indican que sus efectos pueden ser producido probablemente vía receptores opioides presentes en sus células blanco. Este antecedente nos hace proponer la existencia de este tipo de receptores en las células 32D.

El estudio de las casomorfina y sus efectos biológicos se ha incrementado en fechas recientes, debido a que dichas moléculas son derivadas de productos alimenticios como son la leche y sus derivados, así como también las sales derivadas de la caseína (caseinatos, los cuales se usan ampliamente en la industria alimenticia). A finales de la década pasada se realizaron varias investigaciones en donde se determinó que las concentraciones de las casomorfina en productos lácteos son cercana a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hernández, 1999), mientras que en el intestino las concentraciones de péptidos derivados de las caseínas son de hasta 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Yvon, 1986), y en la circulación se reportan concentraciones de 2 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptidos de α y κ -caseína en humanos después de la ingesta de leche o yogurt (Chabance et al, 1998). En el presente estudio establecimos que las concentraciones de casomorfina que afectaron la proliferación de células hematopoyéticas fueron de 0.0316 a 31.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [4×10^{-8} a 4×10^{-6} M] para 1-7 β -casomorfina y de 0.0058 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [1×10^{-5} M] para la 1-5 β -casomorfina; estas concentraciones son menores a las que se han encontrado en condiciones fisiológicas dentro del organismo humano después de la ingesta de un vaso de leche para otros péptidos derivados de las caseínas (Chabance et al, 1998). Estos antecedentes y nuestros resultados dan la pauta para establecer una nueva hipótesis en donde proponemos que sí éstos péptidos fuesen generados por enzimas digestivas después de la ingesta de leche o productos lácteos de manera normal y lograran entrar a torrente sanguíneo pudieran estar afectando o a células hematopoyéticas progenitoras mieloides.

Así mismo varios investigadores se han enfocado a evaluar el efecto de las casomorfina en células tumorales, en sus resultados emplean concentraciones

picomolares (pM) para lograr una inhibición en la proliferación de líneas celulares de cáncer de seno y próstata; y han sido propuestas como potenciales agentes terapéuticos contra estos tipos de cáncer (Kampa 1996; Hatzoglou, 1996), y nuestros datos señalan que péptidos como la 90-95 α -casomorfina no afecta a las células hematopoyéticas 32D. Sí consideramos que una de las principales desventajas de las terapias anticancerígenas es el daño a células hematopoyéticas progenitoras y maduras, por lo tanto sí los resultados en células tumorales y los del presente proyecto se pueden conservar *in vivo*, algunas casomorfinas tienen una potencial relevancia terapéutica al comportarse como compuestos que inhiben la proliferación de células tumorales y con la ventaja de que no afectan a células hematopoyéticas normales.

CONCLUSIONES

La 1-5 β -casomorfina a una concentración intermedia inhibe la proliferación de las células 32D hasta en un 38 %.

La 1-7 β -casomorfina a concentraciones más bajas tiene un mayor porcentaje de inhibición, lo cual habla de un efecto mayor sobre las células en estudio.

No existen alteraciones en la viabilidad de las células 32D con ninguna de las concentraciones de casomorfinas utilizadas aun con las que la proliferación se ve abatida.

Ninguna de las casomorfinas evaluadas presentan efectos inductores de diferenciación de la línea celular mieloide 32D.

BIBLIOGRAFIA.

1. Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología Celular y Molecular. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Buenos Aires, Argentina 2002.
2. Aschkenasy A. Effets comparés de la caséine et de divers melanges amino-acides sur la restauration de lérythropoiese, de la neutropoiése et de la lymphopoiése chez des rats prepares par une privation prolongée de protéines. Nouvelles études. Arch Sci Physiol 1971;25:415-430.
3. Blanco P, Riminucci M, Grothos S, Robey P. Bone marrow stromal stem cell. Nature, biology and potential applications. Stem Cells 2001;19:180-192.
4. Bondurant M and Koury M. Origin and development of blood cells . In Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Gress J, Rodgers G. Wintrobe's Clinical Hematology. 10ma. ed. Lippincott Williams & Wilkins USA, 1999:145-168.
5. Breitman T, Chen Z, Takahashi N. Potential applications of cytodifferentiation therapy in hematologic malignancies. Sem Hematol 1994; 31:18-25.
6. Broxmeyer H, Kim C. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activites. Exp Hematol 1999;27:1113-1123.
7. Cartwright GE. El laboratorio en el diagnóstico hematológico. 4ta ed. Barcelona, Científico-Médica,1972.
8. Cecil Bennet JC, Plum F. Tratado de Medicina Interna. Ed. Mc Graw-Hill. Vol I. México, 1996.

9. Chabance B, Marteau P, Rambaud J, Samour M, et al. Casein peptide and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 1998;80:155-165.
10. Chen G, Zhu J, Geng X, Hua J, Zhang H, Jin X, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML α /PLM proteins. *Blood* 1996;88:1052-1061.
11. Clark SC and Karmen R. The human hemopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987;236:249.
12. Cumano A and Godin I. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. *Curr Opin Immunol* 2001;13:166-171.
13. Dawson M, Elstner E, Kizaki M, Chen D, Pakkala S, Kerner B, et al. Myeloid differentiation mediated through retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RXR) not RXR/RXR pathway. *Blood* 1994;84:446-452.
14. Diggs LW. La morfología de las células de la sangre humana. En frotis de sangre periférica y de médula ósea teñidos con el colorante de Wright. Chicago. Abbott Laboratorios. USA, 1971.
15. Elitsur Y and Luk G. Beta-casomorphin (BCM) and colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol* 1991;85:493-497.
16. Elliot M and Blom J. β -casomorphin causes hypoalgesia in 10 day old rats: Evidence for central mediation. *Pediatric Res* 1996;310:217-223.
17. Flores F E. El papel del microambiente hematopoyético en la fisiología de los síndromes mielodisplásicos (Tesis Doctoral). México: UNAM, 2000.

18. Freshney R. Culture of animal cells. Wiley-Liss Inc. USA. 1994 Third edition
19. Goo M and Hay B. Cell proliferation and apoptosis. *Curro Opinion Cell Biol.* 1999;11:745-752.
20. Greenberger J, Sakakeeny M, Humphries R, Eaves C, Eckner R. Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2931-2935.
21. Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martín PM, Castanas E. Antiproliferative and receptor binding properties of α - and β -casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol* 1996;310:217-223.
22. Hernandez-Sanchez, Beloso-Morales, Jaramillo-Flores. Determination of β -casomorphins in some Latin American dairy products. The IFT Annual Meeting. 1999.
23. Humphries R, Eaves A, Eaves C. Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3629-3633.
24. Jandl J. *Blood: Pathophysiology*. 1st ed. Blackwell Scientific Publications, Inc. USA, 1991.
25. Jinsmaa Y and Yoshikawa M. Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. *Peptides* 1999; 20: 957-962.
26. Jolles P, Levy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillensen D, Thomaidis A, et al. Analogy between fibrinogen. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *Eur J Biochem* 1986; 158: 379-382.

27. Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Castana E. Identification of novel peptide(Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α_{s1} -casein(α_{s1} -casomorphin and α_{s1} -casomorphin amide). *Biochem J* 1996;319:903-908.
28. Kayser H and Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett* 1996; 382: 18-20.
29. Koletzko B, Agget P, Bindels J, Bong P, Ferre P. Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British J Nutrit* 1998; 80, Suppl 1, S5-S45.
30. Kreider B, Phillips P, Prystowsky M, Shireat N, Pierce J, Tushinki R, et al. Induction of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor by granulocyte CSF increase the differentiative options of a murine hematopoietic progenitor cell. *Mol Cell Biol* 1990;10:4846-4853.
31. Lee R, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 1998. 10 ma ed. Vol.1
32. Linnekin D, Park L, Farrar W. Dissociation of human cytokine receptor expression and signal transduction. *Blood* 1992;80:1986-1994.
33. Mayani H., *Biology of the hemopoietic microenvironment*. *Eur J Haematol*. 1992;49:225.
34. Mc Donal G, Paul J, Cruickshank B. *Atlas de Hematología*. 5ta ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid España, 2001.
35. Mckenzie S. *Hematología Clínica*. *El Manual Moderno*. México, 2000.
36. Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolimers* 1997;43:119-128.

37. Meisel H and Bockelmann W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leewenhock* 1999;76:207-215.
38. Metcalf D. Hematopoietic regulators: Redundancy or subtlety?. *Blood* 1993;82:3515.
39. Moore M. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 1991;78:31-37.
40. Morishita K, Parganas E, Matsugi T, Ihle. Expression of the Evi-1 zinc finger gene in 32D Dcl3 myeloid cells blocks granulocytic differentiation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Moll cell Biol* 1992;12:183-189.
41. Morrison S, Uchida N, Weissman I. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Biol* 1995;11:35-71.
42. Muehlenkamp M and Warthesen J. β -Casomorphins: Analysis in Cheese and susceptibility to proteolytic enzymes from *Lactococuss lactis* ssp. *cremoris*. *J Dairy Sci* 1996;79:20-26.
43. Okano M, Ohnota H, Sasaki R. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoyetin concentration and the population size of erythoid precursor cells. *J Nutr* 1992;122:1376-1383.
44. Pasotti D, Mazzone A, Frigo G. The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Med Farmacol* 1993;2:71-81.
45. Rabgaoui N, Guerin M, Torreilles J. Casein derived peptides can modulate the production of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid in human neutrophils. *Biochem Cell Biol* 1994;72:305-310.

46. Ramos G, Santiago E, Martínez I, Manrique B, Weiss B. El caseinato de Sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Invest Clin* 2000; 52: 638-644.
47. Ramos G, Lagunes H, Ledesma E, Galvan A, Weiss B, Santiago E. Efecto del CasNa en la proliferación y viabilidad de células leucemicas y células monoclonales de médula ósea. *Rev Biomédica* 2001;12 suplemento 1:S33-34.
48. Read L, Lord A, Brantl V, Koch G, Absorption of β -casomorphin from autoperfused lamb and piglet small intestine. *Am J Physiol* 1990;259:6443-6452.
49. Ruiz A G J. *Fundamentos de Hematología*. 2ed. México, 2003.
50. Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* 2003;10:9-16.
51. Stites D. *Basic and clinical immunology*. 8° edición. USA 1996.
52. Soto CI, Cáceres CJ, Mendoza RJ, Weiss SB. *Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: mecanismos celulares y moleculares*. México, 1999.
53. Sun T, Li C, Yam L. *Atlas of cytochemistry and immunochemistry of hematologic neoplasms*. ASCP Pres, Chicago. IL. USA 1985.
54. Svedberg J, De Hams J, Leimenstoll, Teschemater H. Demonstration de of β -casomorphin immunoreactive materials in vitro digests of bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides Fayetteville* 1985;6:825-830.
55. Takeda M, Minowada J, Bloch A. Kinetics of appearance of differentiation-associated characteristics in ML-1. A line of human myeloblastic leukemia cells, after treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, Dimethyl sulfoxide, or 1- β -D arabinofuranosy-tosine. *Cancer Res* 1982;42:5152-5158.

56. Tatsuta M, Lishi H, Baba M, Taniguchi H. Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in Wistar rats fed a low-protein diet. *Int J Cancer* 1992;50:108-111.
57. Toba K, Koike T, Wang Y, Nagai K, Takahashi H, Hashimoto S, et al. Prediction of growth sensitivity of acute promyelocytic leukemia cells to granulocyte colony-stimulating factor using 7AAD/PY during administration of all-trans retinoic acid. *Int J Hematol* 1997;66: 203-212.
58. Valtieri M, Tweardy D, Caracciolo D, Johnson K, Mauilio Altamann S, et al. Cytokine-dependent granulocyte differentiation. Regulation of proliferative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol* 1987;138:3829-3835.
59. Weissman I. Stem cells: Units of development, Units of regeneration, and Units in Evolution *Cell* 2000;100:157-168.
60. Wheton A and Dexter T. Myeloid haemopoietic growth factors. *Bochim Biophys Acta* 1989;989:111-132.
61. Wheton A and Sponcer E. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:721-726.
62. William S. Hematology. 5th ed. The MIT Press Cambridge. London England. 1991.
63. Wong C, Seow H, Liu A, Hunsbad A, Smithers G, Watson D. Modulation of immune responses by bovine α -casein. *Immunol Cell Biol* 1996;74:232-239.
64. Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers* 1997;43:129-134.

65. Yoshikawa H, Sakihama T, Nakajima Y and Tasaka K. Co-stimulation of fibronectin promotes FcγR-mediated rescue of IL-3 dependent bone marrow-derived cells from apoptosis. *J Immunol* 1996;156:1832-1840.
66. Yvon M, Pélossier J, Guilloteau P, Toullec R. Digestion des protéines du lait dans la caillette du veau pré-ruminant. *Reprod Nutr Dévelop* 1986 ;26 :705-715.
67. Zucker D, Greaves M, Grossi C and Marmont A. Atlas of blood cells. Function and pathology. 2^o ed. Arti Grafiche Salea, Italy. 1988:761.
68. Zuckerman KS, Prince CW, Gay S. The hemopoietic extracellular matrix, in Tavassoli. 1989. The handbook of the hemopoietic microenvironment Humana PreRRtnc399.
69. Zucht H, Raida M, Adermann K, Marget H, Forssmann W. Casocidin-1:α-casein alpha-S2-derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters* 1995;372:185-188.