



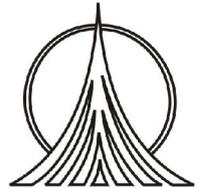
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE PÉPTIDOS DE
CASEÍNA EN LA PROLIFERACIÓN Y
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS
32D Y WEHI-3.**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A
LAURA MUÑOZ GALINDO

DIRECTOR: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO



FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE DE 2005



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.

ÍNDICE

Índice.....	VI
Lista de abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
Marco Teórico.....	4
Hematopoyesis.....	4
Líneas celulares.....	7
Citocinas Hematopoyéticas.....	9
Caseína y hematopoyesis.....	14
Péptidos de la caseína.....	16
Actividades generales.....	18
Planteamiento del problema.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	24
Materiales y Métodos.....	25
Resultados.....	31
Evaluación del efecto del HC en la proliferación de células 32D y WEHI-3.....	31
Evaluación de la viabilidad de células 32D y WEHI-3 tratadas con HC, CasNa y péptidos de κ-caseína.....	31
Evaluación del efecto de los péptidos de κ-caseína en la proliferación de células 32D y WEHI-3.....	35
Evaluación del efecto de CasNa, HC, y péptidos de κ-caseína en la diferenciación de células 32D y WEHI-3.....	39
Evaluación morfológica.....	39
Evaluación citoquímica.....	42
Evaluación de expresión de antígenos de superficie.....	49
Discusión de Resultados.....	59
Conclusiones.....	63
Bibliografía.....	64
Apéndice.....	71

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM. Bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio y con el apoyo de la DGAPA, UNAM PAPIIT (IN203501 e IN214903).

A mis padres

(Micaela Galindo y Guillermo Muñoz)

A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme
en una persona de provecho.

A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni
con las riquezas más grandes del mundo.

A quienes agradezco por toda una vida de esfuerzos,
sacrificios e infinita dedicación.

Porque gracias a su apoyo, amor, consejo y confianza he llegado a realizar
una de las más grandes de mis metas,
la cual constituye; la herencia más valiosa que pudiera recibir.

Deseo de todo corazón que mi triunfo profesional
lo sientan como suyo,
porque mis conceptos, mis valores y mi superación se los debo a ellos.

A mi hermano

(Guillermo Muñoz)

Porque tu presencia fue siempre un motivo más
que me impulsó para lograr esta meta.
Gracias por todo tu cariño y apoyo incondicional que durante toda
tu vida me has brindado.

A mi novio

(Armando Tovar)

Para ti que eres una razón más para seguir adelante.
Para ti que siempre has estado conmigo y de quien solo he
recibido apoyo, amor y confianza.
Por todo eso, mi eterno y sincero agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por la excelente dirección de este trabajo de tesis, por todo el apoyo, confianza y facilidades que me brindó durante la estancia en el laboratorio.

Al Dr. Gerardo Ramos Mandujano a quien le expreso un gran sentimiento de gratitud por compartir sus conocimientos para la realización de este trabajo.

Al Dr. Federico Centeno del CINVESTAV por su valiosa colaboración en la lectura de las muestras de Citometría de Flujo.

Al Dr. Alberto Monroy García por su colaboración en la esterilización de los péptidos mediante Cesio-137.

A los Miembros del Jurado.

Biól Carlos Martínez Montoya.

Dra. Elia Roldán Reyes.

M. en C. Luis Sánchez Sánchez.

M. en C. Jorge Hernández Montes.

Por las sugerencias y comentarios recibidos que ayudaron a enriquecer éste trabajo.

Así como a mis compañeros de laboratorio y demás colegas, agradezco su amistad, amabilidad, cooperación y todas las atenciones que han tenido conmigo.

A mi gran familia, empezando por mis abuelos, tíos, tías, primos, primas, amigos y amigas por los consejos y palabras de aliento para seguir siempre adelante.

Por su apoyo y colaboración.

GRACIAS

ABREVIATURAS

μCi	Microcurie.
μL	Microlitro.
ACE	Enzima convertidora de angiotensina.
ATCC	American Type Culture Collection.
CasNa	Caseinato de Sodio.
Célula NK	Célula natural asesina.
CFU o CFC	Unidad Formadora de Colonias.
CMP	Caseinomacropéptido.
CPH	Célula progenitora hematopoyética.
CPM	Cuentas por minuto.
Cs-137	Cesio-137.
CSF	Factor estimulador de colonias.
CTH	Células tallo hematopoyéticas.
Epo	Eritropoyetina.
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína.
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos.
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
HC	Hidrolizado de caseína.
IL-3	Interleucina-3.
IMDM	Medio Iscove's Modificado Dulbecco.
Kg	Kilogramo.
LT-HSC	Célula tallo hematopoyética-reconstituyente a largo plazo.
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1.
MCP-3	Proteína quimiotáctica de monocitos 3.
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos.
M-CSFR	Receptor del M-CSF.
mg	Miligramo.
MIP-1^a	Proteína inflamatoria de macrófagos 1-a.
MIP-1b	Proteína inflamatoria de macrófagos 1-b.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
ng	Nanogramo.
PBS	Amortiguador de fosfatos.
RANTES	Factor expresado y secretado por linfocitos T normales.
RC	Receptores de citocinas.
rmIL-3	Interleucina-3 recombinante de ratón.
Rpm	Revoluciones por minuto.
RTC	Receptores de tirosina cinasa.
SCF	Factor de células tallo.
SFB	Suero fetal bovino.
TGF	Factor de crecimiento transformante.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
Tpo	Trombopoyetina.

RESUMEN

Desde varias décadas atrás surgieron evidencias de la participación de la Caseína (proteína más abundante de la leche) en la hematopoyesis, ya que una dieta desprovista de Caseína provoca mielosupresión, mientras que la Caseína restablece la hematopoyesis. Otros datos indican que puede activar a los leucocitos ya que la Caseína o su sal, el Caseinato de Sodio (CasNa), inyectada vía intraperitoneal en ratones o peces, inducen una respuesta inflamatoria, promoviendo inicialmente la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal. Nuestro grupo de trabajo mostró que el CasNa bloquea la proliferación a favor de la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D de ratón, colocándolo como un inhibidor de la hematopoyesis.

A través del tiempo, la leche y sus derivados han sido reconocidos por su alto valor nutricional, pero además de este papel, las proteínas de la leche tienen importancia como una fuente potencial de péptidos biológicamente activos, ya que se les atribuyen efectos opioides (agonistas y antagonistas), antihipertensivos, inmunomoduladores, antibacteriales, antitrombóticos, antitumorales entre otros, pero su papel en la hematopoyesis es poco conocido, por lo que este trabajo tiene como finalidad, evaluar la participación del hidrolizado de caseína (HC), CasNa y 3 péptidos de κ -caseína, como moduladores de la proliferación y diferenciación de las líneas celulares 32D y WEHI-3.

Los resultados demuestran que el CasNa, HC y el fragmento peptídico 25-34 de κ -caseína, tienen la propiedad de bloquear la proliferación de la línea hematopoyética multipotencial de ratón 32D, y de la línea leucémica mielomonocítica WEHI-3, y de inducir la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo. El fragmento peptídico 35-41 de κ -caseína reduce la proliferación en ambas líneas celulares e induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago en células 32D, y en células WEHI-3 lo hace hacia el linaje granulocito-neutrófilo, mientras que el fragmento peptídico 58-61 no tiene efecto en la proliferación de ninguna de las dos líneas, pero induce diferenciación hacia el linaje granulocito-neutrófilo en ambas líneas celulares. Esta reducción de la proliferación no se debe a un posible efecto citotóxico de las moléculas.

Con base en lo anterior se puede concluir que el CasNa, HC y los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína modulan la proliferación y diferenciación tanto de las células hematopoyéticas normales como de las células leucémicas. Por tanto, con estos resultados surge la necesidad de plantear la posibilidad de que la leche, vía péptidos de caseína, puede modular la hematopoyesis *in vivo*, por lo que sería interesante identificar con exactitud el o los péptidos implicados.

MARCO TEÓRICO

HEMATOPOYESIS

Las células sanguíneas maduras presentes en la circulación, desempeñan una gran variedad de funciones fundamentales para el organismo, los eritrocitos transportan el oxígeno, las plaquetas participan en el control de la coagulación sanguínea, mientras que los granulocitos, monocitos y linfocitos intervienen en la defensa inmunitaria contra los agentes extraños (Zambrano *et al.*, 1999). Estas células tienen periodos de vida relativamente cortos muriendo por senescencia o durante el desarrollo de sus funciones normales (Hughes-Jones & Wickramasingh, 1991). La pérdida de las células sanguíneas es rápidamente equilibrada por la formación de nuevas células sanguíneas, mediante el proceso conocido como **hematopoyesis** (**haima**-sangre; **poiesis**-producción) (Orkin, 1995).

La hematopoyesis en el humano inicia en el saco vitelino durante los primeros días de desarrollo prenatal, posteriormente las células del saco vitelino migran hacia el hígado, timo y el bazo fetal, convirtiéndose en los principales órganos hematopoyéticos en el segundo trimestre de desarrollo (Toles *et al.*, 1989), finalmente la actividad hematopoyética pasa a la médula ósea fetal hacia el tercer trimestre (Morrison *et al.*, 1985; Yorder, 2001). La médula ósea después del nacimiento es el principal sitio hematopoyético en el individuo. Durante los primeros cuatro años de vida, la médula ósea de todos los huesos contribuye a la hematopoyesis (Munker *et al.*, 1998). Posteriormente en la vida adulta, la hematopoyesis queda restringida a ciertos sitios que son: los huesos pélvicos, la columna vertebral, las regiones proximales de fémur y el húmero, el cráneo y el esternón (Hughes & Wickramasingh, 1991).

Las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente particular llamado microambiente hematopoyético (Prosper *et al.*, 2001). El microambiente hematopoyético está compuesto de un componente celular y un componente proteico, el cual está constituido por distintos tipos celulares y proteínas extracelulares. Las células que constituyen de manera permanente el microambiente hematopoyético conocidas como células del estroma medular o estromales, son principalmente fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos, adipocitos y células accesorias (monocitos, linfocitos y células NK) denominadas así por estar de manera transitoria en el microambiente.

La principal función de las células estromales es promover el microambiente propicio para favorecer la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas de los diferentes linajes hematopoyéticos (Linaje mieloide: eosinófilos basófilos, neutrófilos, granulocitos, monocito-macrófagos, megacariocitos y eritrocitos; Linaje linfoide: Linfocitos T y B). Éstas células principalmente secretan proteínas (componente proteico) como la colágena, fibronectina, laminina y proteoglicanos que constituyen la matriz extracelular, o proteínas conocidas como citocinas o factores de crecimiento (HGF por sus siglas en inglés Hematopoietic Growth Factor) que regulan la fisiología de las células hematopoyéticas y sus precursores (Munker *et al.*, 1998; Prosper *et al.*, 2001).

La hematopoyesis es sustentada a partir de la proliferación y diferenciación de un grupo de células conocidas como células tallo hematopoyéticas (CTH) (Orkin, 1995). Estas células son pequeñas y con poco citoplasma, se concentran principalmente en el estroma de la médula ósea, se caracterizan por su alta capacidad proliferativa y de auto-renovación (Ogawa & Matsunaga, 1999; Orlic & Bodine, 1994), así como por la ausencia de características morfológicas o histoquímicas, propias de las células maduras o comprometidas hacia algún linaje celular. En condiciones normales la mayoría de estas células se encuentran quiescentes (Fase G₀ del ciclo celular). Estas células son consideradas totipotenciales, dado que son susceptibles de comprometerse hacia cualquiera de los linajes celulares sanguíneos mieloides y linfoides, cuando son estimuladas con la combinación de diferentes citocinas (Morrison *et al.*, 1995; Ogawa, 1993), además tienen la capacidad para reconstruir la hematopoyesis a corto y largo plazo, en individuos mielosuprimidos después de una quimioterapia (Morrison *et al.*, 1995), y solo constituyen menos del 0.005% de las células mononucleadas en médula ósea.

Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) derivan de las CTH, incapaces de autorrenovarse y con características de pluripotencialidad, bipotencialidad y monopotencialidad, generan gran cantidad de células sanguíneas maduras requeridas por el organismo, constituyen el 0.15% de las células de la médula ósea. Cuando los progenitores multilíneaje son estimulados apropiadamente, generan colonias en cultivos semisólidos, generalmente se les denomina unidad formadora de colonias (CFU o CFC). Dentro del linaje mieloide se reconocen a las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), las células formadoras de colonias de eosinófilos

(CFU-Eo), de basófilos (CFU-Ba), de megacariocitos (CFU-Mk), y la única célula considerada bipotencial que da origen a macrófagos y granulocitos (CFU-GM) y de células dendríticas (CFU-Dc) (Akashi *et al.*, 2000). Con relación al linaje linfoide se considera que las células Pre-T y Pre-B derivan directamente de los linajes LT-HSC que pueden provenir de los CFU-S (Dexter, 1989).

Las células precursoras corresponden a las etapas finales de diferenciación, componen más del 99.5% de las células presentes en médula ósea, y pueden ser reconocibles fácilmente por su morfología, además, existe una notable o total disminución en su capacidad proliferativa.

Las células maduras representan el último estadio de diferenciación de los elementos hematopoyéticos, las cuales sufren una dramática especialización, se identifican fácilmente por su morfología, dan origen a las células sanguíneas circulantes, son varios tipos de células completamente distintas en apariencia y con funciones específicas (Munker *et al.*, 2000). Este modelo de clasificación indica que existe una jerarquización hematopoyética, en donde las células tallo son los elementos más primitivos que dan lugar a la formación de todos los constituyentes del sistema hematopoyético (Figura 1).

La capacidad de proliferación es muy acentuada en las células tallo, prácticamente se reduce a la mitad en el compartimiento de las células progenitoras comprometidas y es extremadamente reducida o nula en el compartimiento de las células maduras, mientras el grado de diferenciación es inverso (Dexter, 1989).

Una pérdida en el control de la proliferación de las células tallo puede traducirse en un descontrol de la hematopoyesis total, como por ejemplo la proliferación sin control de las células tallo hematopoyéticas termina en el desarrollo de una leucemia, también conocida como cáncer de sangre (Passegué *et al.*, 2003).

Líneas Celulares

El estudio de la hematopoyesis normal se ha facilitado gracias a la obtención de clones de líneas hematopoyéticas multipotenciales “normales”. Las líneas celulares normales pueden cultivarse por tiempo indefinido pero retienen la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes celulares mieloide y linfoide.

La línea celular 32D, dependiente de interleucina-3 (IL-3), fue establecida por cultivo a largo plazo de médula ósea de ratón C3He/J inyectado con el virus de la leucemia murina Friend (Ahmed *et al.*, 1999), a pesar de liberar al medio cantidades detectables de transcryptasa reversa, no libera virus infectivos y además no induce tumores cuando son transferidas a hospederos histocompatibles. Por lo tanto la línea 32D es considerada como una población celular inmortalizada, no maligna y ampliamente usada como modelo en el estudio de la hematopoyesis (Greenberger *et al.*, 1983). Dentro de la jerarquización hematopoyética las células 32D son clasificadas como células progenitoras hematopoyéticas multipotenciales.

Un ejemplo de línea leucémica, lo constituye la línea celular leucémica mielomonocítica de ratón WEHI-3 que crece en cultivo desde enero de 1974, establecida de sangre periférica de ratón, secreta al medio CSA (colony-stimulating activity) (Ralph *et al.*, 1976, 1977), lisozima (LZM) e interleucina-3 (IL-3). Sin embargo su crecimiento es inhibido por 4 ng/mL de LPS; la administración de sulfato dextran de 30-40 g/mL también inhibe su crecimiento. Dentro de la jerarquización hematopoyética las células WEHI-3 son clasificadas como células hematopoyéticas inmaduras o progenitoras mielomonocíticas, y es ampliamente empleada en el estudio del control de la proliferación y diferenciación de células leucémicas.

HEMATOPOYESIS

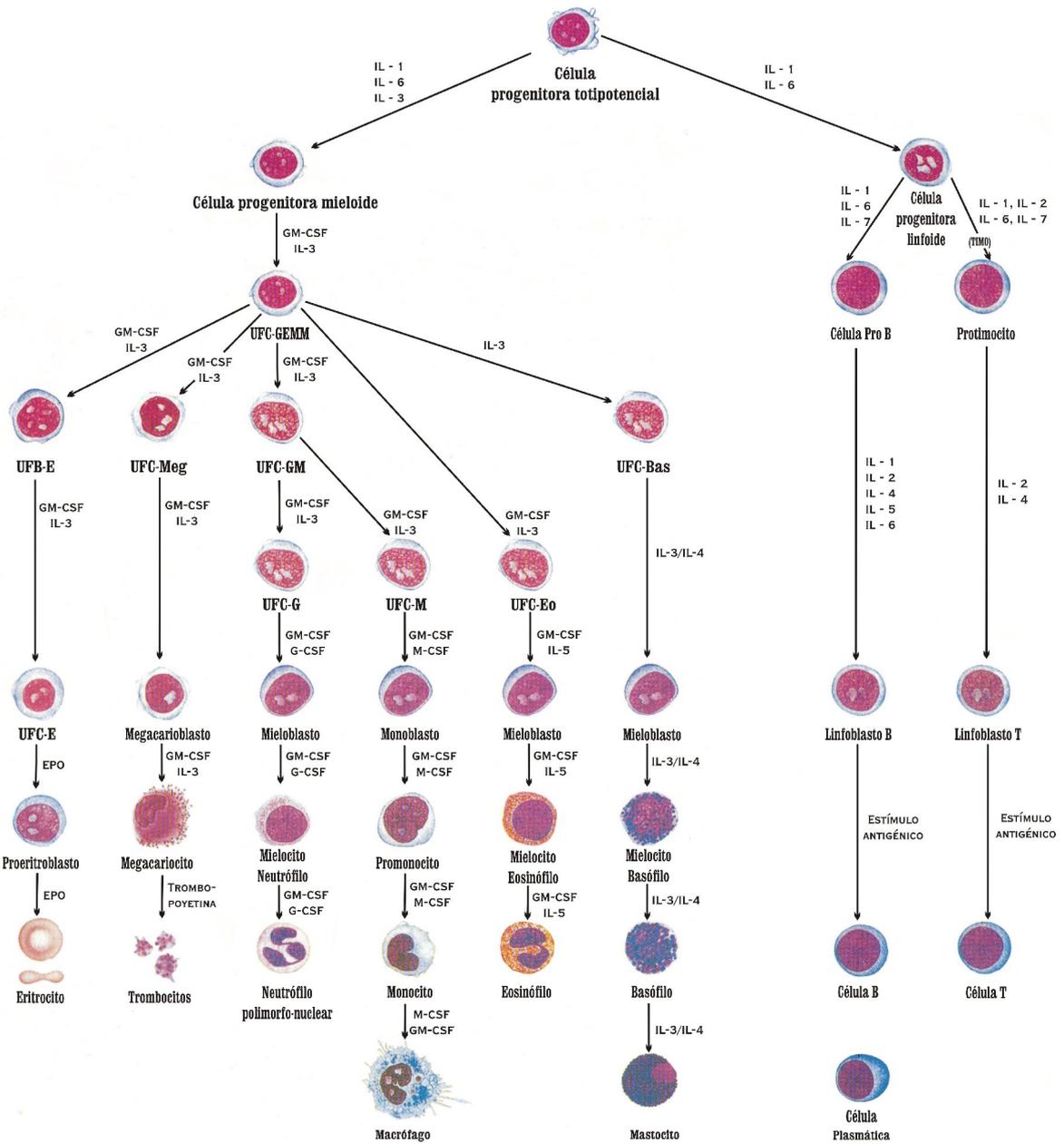


Figura 1. Modelo jerárquico de la Hematopoyesis. Células Hematopoyéticas Progenitoras y Maduras. (Tomado y modificado de Schering Plough- SANDOZ)

CITOCINAS HEMATOPOYÉTICAS

El control de la hematopoyesis es regulado por una serie de proteínas o glicoproteínas (Metcalf, 1998), que son de bajo peso molecular (por lo general menos de 30 kDa). Aunque existen muchos tipos de células productoras de citocinas, dentro del sistema inmune natural los macrófagos son las células más comprometidas en la síntesis de citocinas, mientras que en el sistema inmune específico son las células T colaboradoras. Dentro de las citocinas se agrupan: interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores de crecimiento, factores de necrosis tumoral (Aguirre de Avalos, 2002). Estos moduladores ejercen su actividad de manera autócrina, parácrina ó endócrina, con efectos variables que comprenden la modulación de la respuesta inmune, el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas, la regeneración tisular y la angiogénesis entre otros.

Los cultivos *in vitro* del tejido hematopoyético a largo plazo ha permitido establecer que la hematopoyesis se sostiene debido a que las células integrantes del estroma secretan diversas citocinas tales como Interleucinas (IL) (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-10, IL-13, entre otras), factores estimuladores de colonias (CSF) ya sea de tipo granulocito-macrófago (GM-CSF), de macrófagos (M-CSF) o de granulocitos (G-CSF), así como el factor de células tallo (SCF), factor de necrosis tumoral (TNF), ó factor de crecimiento transformante (TGF) (Quesenberry & Levitt, 1979). Dentro de las citocinas producidas por las células del microambiente, existen algunas que actúan predominantemente como estimuladores de la hematopoyesis; otras, en cambio, actúan como inhibidores, pero en condiciones normales, existe un balance entre las citocinas estimuladoras e inhibidoras, lo que da como resultado la producción controlada de células sanguíneas (Tabla 1). Funcionalmente presentan retroregulaciones 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 otras citocinas y/o modular negativa o positivamente los efectos de dichas citocinas.

Por otro lado, al actuar sobre diferentes tipos celulares, ejercen múltiples efectos (pleiotropía) e igualmente comparten muchos de ellos (redundantes), producen un efecto que se potencia mutuamente (sinergismo), pero también existe bloqueo mutuo de sus efectos (antagonismo) o algunas citocinas tienen un efecto relativamente específico sobre un linaje.

La producción de las citocinas suele ser breve (transitoria), limitada al lapso de tiempo que dura el estímulo (Aguirre de Avalos, 2002).

Entre la investigación de citocinas en las actividades de las células hematopoyéticas se ha reportado que la administración *in vivo* de G-CSF, Epo o Tpo, tienen efectos relativamente específicos en la producción de granulocitos, eritrocitos o plaquetas respectivamente (Socolovsky *et al.*, 1998), en contraparte GM-CSF, IL-3 y SCF, actúan sobre progenitores de varios linajes, incluyendo células primitivas (Barreda *et al.*, 2004).

Para que los factores de crecimiento hematopoyético ejerzan su actividad deben unirse a receptores específicos sobre las células blanco. La formación del complejo ligando receptor trae como consecuencia el desencadenamiento de señales intracelulares a través de la activación de tirosina cinasas, dando como resultado final la activación celular y una determinada respuesta biológica. En general, los receptores para citocinas tienen un dominio extracelular de unión al ligando, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático.

Con base en la homología de los dominios relevantes en la transducción de señales de los receptores, se han dividido en dos grupos principales: la familia de receptores de tirosina cinasa (RTC) y los receptores de citocinas (RC). Los primeros tienen un dominio citoplasmático con actividad de tirosina cinasa responsable directo de iniciar las señales intracelulares. Los RC a pesar de que no se les conoce un sitio evidente de actividad tirosina cinasa, la unión de su ligando induce la fosforilación de tirosina de varias fosfoproteínas celulares (Hallek, 1995).

Principales tipos de respuesta por la acción de las citocinas

Generalmente actúan como mensajeros intercelulares produciendo:

1.- Activación de los mecanismos de inmunidad natural.

- a) Activación de macrófagos y otros fagocitos, de las células NK, de los eosinófilos, inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado.

2.- Activación y proliferación de células B, hasta su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos.

- 3.- Intervención en la respuesta celular específica.
- 4.- Intervención en la reacción de inflamación, tanto aguda como crónica.
- 5.- Control de los procesos hematopoyéticos de la médula ósea.
- 6.- Reparación tisular.

CITOCINAS			
Citocina	Peso Molecular (Kd)	Origen	Principales efectos
INTERLEUCINAS			
IL1- α IL-1 β	15-17	Monocitos-Macrófagos.	Fiebre (pirógeno endógeno), sueño, anorexia, inflamación, expresión de CD 54 en las células endoteliales y liberación del factor tisular, activación linfocitaria, producción de IL-6 Y CSF.
IL-2	15-15	Células T.	Induce la proliferación de la célula T, coestimula la proliferación y diferenciación de la célula B.
IL-3	14-28	Células T, Mastocitos.	Potencia a las NK y LAK (agresoras activadas por linfoquinas); activa la hematopoyesis.
IL-4	20	Células T, Mastocitos.	Induce la proliferación del mastocito, proliferación de la célula hematopoyética pluripotencial.
IL-5	45	Células T, mastocitos.	Induce la proliferación de la célula T y la generación de LTC, coestimula la proliferación de la célula B, sinergiza con la IL-3 en la proliferación del mastocito, estimula la producción de Ig E e Ig G 4, induce la expresión y liberación de CD 23, la clase II del CMH en la células B, cambia de T_H a T_{H2} .
IL-6	23-30	Monocitos, Fibroblastos.	Induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de Ig A.
IL-7	25	Células de la médula ósea y del estroma tímico.	Pirogénica, induce la proliferación de plasmocitomas e hibridomas, aumenta la producción de Ig, la clase I en los fibroblastos, acción con la IL-2 en la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de la célula hematopoyética, induce la diferenciación del LTC, Induce la proliferación de las células pro y pre-B de los linfocitos inmaduros.
IL-8 (quimioquina)	6.5	Monocitos, células endoteliales, macrófagos alveolares, fibroblastos.	Induce la quimiotaxis y activación de neutrófilos y células T.
IL-9	30-40	?	?
IL-10	17-21	Células T.	Induce la proliferación de algunas células T, potencia la proliferación del mastocito inducida por la IL-3.
IL-11	24	Células T, células B activadas y monocitos.	Inhibe la activación del MAC, estimula la producción de células B y la producción de Ac, estimula los mastocitos y cambia de T_H a T_{H2} .
IL-12	75	Células del microambiente hematopoyético.	Estimula la producción de Ac, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de megacariocitos, estimula los progenitores del macrófago.
IL-13	10	Monocitos, macrófagos, algunas células B y mastocitos.	Activa a las NK para secretar IFN-gamma, cambia T_H a T_{H1} , inhibe la producción de Ig E inducida por la 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 Ig E.
IL-16	56	Células T.	Induce la proliferación de las células B.
IL-17	20-30	Células no linfoides, musculares.	Induce la proliferación y citotoxicidad de las células NK, diferenciación de las células NK.
IL-18	?	Células endoteliales y monocitos.	Inmunomodulatoria.
INTERFERONES			
IFN- α	18-20	Linfocitos.	Coestimula la producción de las células T, induce la secreción de la IL-6, IL-8 y G-CSF a partir de las células endoteliales, epiteliales y fibroblástica.
IFN- β	20	Fibroblastos y células amnióticas.	Incrementa la expresión de antígenos de clase I y II HLA. Y la actividad de células NK. Induce el factor Inductor del IFN-gamma similar a la IL-1.
IFN- γ	20-25	Linfocitos CD 4+ y CD 8+, células NK y Th 1.	Posee efectos antivirales e inmunomodulatorios. Es quimiotáctico para monocitos y aumenta en ellos la expresión de HLA clase I.

Tabla 1. Citocinas que regulan la actividad biológica de las células hematopoyéticas, (Tomado de Aguirre de Avalos, 2002).

FACTORES DE NECROSIS TUMORAL (TNF)			
TNF- α (caquectina)	17	Fibroblastos, células NK, neutrófilos, astrositos, células endoteliales y células del músculo liso.	Proinflamatorio, antitumoral. Agente neovascularizante y estimulante de la resorción ósea.
TNF- β (linfotaxina)	25	Linfocitos.	Ídem anterior.
FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS (CSF)			
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 la línea de granulocitos-neutrófilos. Estimula la actividad de PMN maduros.
M-CSF	70-90	Monocitos-macrófagos, células endoteliales y fibroblastos.	Estimulación de diferenciación de precursores hematopoyéticos hacia la línea monocítica. Funcionalidad de monocitos y macrófagos maduros.
Eritropoyetina	30	Células intersticiales peritubulares renales, hígado y macrófagos de médula ósea.	Regula la producción de eritrocitos en condiciones normales y recuperación post anémica.
Trombopoyetina	18-70	Hígado, riñón y músculo liso. En menor proporción en bazo y células ítem.	Estimula la proliferación y la diferenciación de las células progenitoras megacariocíticas. Aumenta la producción plaquetaria.
FACTORES ESTIMULADORES DEL CRECIMIENTO			
PDGF		Plaquetas.	Estimula la activación plaquetaria, principalmente actúa regulando mecanismos de adherencia.
TGF- α	5-20	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales.	Induce la proliferación de los progenitores de granulocitos y de monocitos, activa a los macrófagos, aumenta producción de Leucotrienos en el eosinófilo, actividad tumoricida del monocito. Induce la proliferación de granulocitos.
TGF- β	25	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales.	Induce la proliferación de monocitos.
FGF		Tejido conectivo.	Proliferación de fibroblastos, síntesis de colágena y macromoléculas de matriz intersticial.
EGF		Células de lámina basal epidermal.	Crecimiento y diferenciación de epitelios.
ILGF-1 ILGF-2	55-70	Hígado y células del sincitiotrofoblasto respectivamente.	Promueve proliferación y diferenciación de múltiples tejidos contribuyendo al desarrollo corporal postnatal y embrionario.
QUIMIOCINAS			
C (carece del primer y tercer residuo cisteína conservados) Ej.: LINFOTAXINA (LPTN)	Variable	Plaqueta, placenta, riñón, hueso, células T y B.	Induce la angiogénesis, la proliferación de los queratinocitos, la resorción ósea y la proliferación tumoral.
C-C varios Ej.: MIP-1a, RANTES, MIP-1b, EOTAXINAS, MCP-1 Y MCP-3	Variable	CD8 activados, mastocitos.	Induce la quimiotaxis de las células T y NK.
CXC (varios Ej.: IL-18, IP-10, SDF.	Variable		Induce la quimiotaxis de las células T, NK, basófilos y eosinófilos.

Tabla 1. Citocinas que regulan la actividad biológica de las células hematopoyéticas, (Tomado de Aguirre de Avalos, 2002).

CASEÍNA Y HEMATOPOYESIS

La leche contiene una gran cantidad de proteínas, como son, la caseína, albúmina, globulina, proteosa-peptonas y enzimas. La caseína es la principal proteína de la leche (representa del 75-80 % del contenido proteico total de la leche) (Meisel, 1997), se encuentra formada por micelas compuestas por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas α -s₁, α -s₂, β y κ -caseínas (Eigel, 1984), que junto con algunos derivados formados por proteólisis de estas cadenas son incluidas en la categoría de caseínas (Belitz *et al.*, 1999).

El Caseinato de sodio (CasNa) una sal de la caseína, que se obtiene disolviendo caseína en hidróxido de sodio y posteriormente sometido a evaporación, obteniendo un polvo blanco, sin sabor ni olor, soluble en agua y con un 65% de proteínas. Debido a su excelente valor nutricional es ampliamente utilizados en la industria alimenticia como fuente de proteínas en cereales y otros productos secos, especialmente en productos para bebé, productos dietéticos y para diabéticos (Walstra, 1989).

Desde hace ya varias décadas, surgen las primeras evidencias de la participación de la caseína en la hematopoyesis, particularmente porque una dieta desprovista de caseína provoca una mielosupresión, mientras que la adición de caseína la restablecía (Aschkenasy, 1971). En años posteriores se ha revelado que una dieta a partir de caseína induce la producción de eritropoyetina y con ello activa la eritropoyésis (Okano *et al.*, 1992), otros datos indican que puede activar a los leucocitos ya que la sal de la caseína, el caseinato de sodio, inyectada vía intraperitoneal en ratones o peces, inducen una respuesta inflamatoria, promoviendo inicialmente la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal (Passoti *et al.*, 1993; Aranishi *et al.*, 1997).

Adicionalmente se ha reportado un incremento de la concentración de citocinas tipo factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y de granulocitos (G-CSF), tanto en el suero como en el fluido de la cavidad peritoneal de ratones inyectados con CasNa (Lotem *et al.*, 1985). Dentro de la investigación biomédica se ha observado que una dieta baja en caseínas incrementa la posibilidad de presentar tumores en colon de ratas (Tatsura *et al.*, 1992) mientras que una dieta rica en caseínas protege contra el desarrollo del cáncer intestinal en ratas (McIntosh *et al.*, 1995).

Por otra parte existen estudios que indican que la inyección de β -caseína en ratas eleva la producción de anticuerpos (Wong *et al.*, 1996). Además de que modula la proliferación de linfocitos (Monetini *et al.*, 2003). Lo anterior muestra que las caseínas pueden regular al sistema inmune.

Por otro lado nuestro grupo de laboratorio ha proporcionado evidencias de que la inyección de CasNa en la cavidad peritoneal de ratón favorece la acumulación de granulocitos-neutrófilos y de macrófagos, aunque sólo induce la producción de M-CSF en los granulocitos, un factor que promueve la hematopoyesis (Santiago, 1994). También que el CasNa acelera la transición de granulocitos en banda a polimorfonucleares en forma similar al G-CSF, además de que induce la liberación de M-CSF en granulocitos (Bautista, 1998). Este conjunto de datos sugiere que el CasNa tiene la capacidad para inducir la liberación de citocinas.

Otros datos en el laboratorio han dado evidencia de que el CasNa también modula la hematopoyesis. La adición del CasNa al cultivo de células 32D, una línea dependiente de interleucina-3 (IL-3) y ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis “normal”, redujo la multiplicación celular en forma dosis-dependiente a pesar de la presencia de IL-3, además de inducir su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago (Ramos *et al.*, 2000), aunado a la inducción de la expresión del gen del M-CSF y su receptor *c-fms* (Ramos *et al.*, 2004a).

De igual manera se demostró que los tres tipos de caseínas de la leche (alpha, beta y kappa caseína), frenan la proliferación de las células hematopoyéticas normal 32D y leucémicas de ratón WEHI-3 y que la κ -caseína inhibe en mayor medida la proliferación de las células WEHI-3 que en la células 32D (Ramos, 2004b), además en las células 32D inducen la expresión del gen de M-CSF, *c-fms*, del receptor de GM-CSF pero no del ligando GM-CSF, y en las células WEHI-3 inducen la expresión del receptor de GM-CSF (Melo, 2004). Además el CasNa induce la producción de TNF bioactivo en las células 32D (Ledesma, 2005).

Finalmente, hasta el momento se ha demostrado que el CasNa induce la proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratón *in vitro*, lo cual sugiere que las caseínas regulan la hematopoyesis *in vitro* en forma diferencial.

En experimentos *in vivo* se ha reportado que una dieta libre de caseína provoca una reducción en el peso de los ratones así como modificaciones al microambiente hematopoyético debido a alteraciones en la estructura de la matriz extracelular en médula ósea (Vituri, 2000). En nuestro grupo de trabajo la inyección de CasNa vía intraperitoneal, incrementó el número de células mononucleadas en médula ósea, además de aumentar el peso y tamaño del bazo, confirmado por un mayor índice esplénico, evidencia clara de que el CasNa activa la hematopoyesis medular y extramedular, *in vivo* (Lagunes, 2004).

Péptidos de la caseína

En los años 70's un grupo de investigadores, en Munich, detectaron fortuitamente una acción de tipo analgésico en un hidrolizado enzimático de la fracción proteica de la leche. En la misma época, un equipo de estadounidenses demostraba de igual manera la presencia de este tipo de acción en diversos hidrolizados de proteínas alimentarias. Gracias a los trabajos iniciales llevados a cabo en Francia, se establecieron las secuencias completas de las proteínas de la leche y así fue posible determinar rápidamente que unos fragmentos procedentes de las secuencias de las caseínas lácteas poseían una acción de tipo opiáceo, equivalente a las encefalinas endógenas. Lo anterior suscitó la publicación de numerosos trabajos durante los últimos años. Investigaciones posteriores pusieron en evidencia otros tipos de acciones biológicas vinculadas a los péptidos procedentes de secuencias de proteínas lácteas, a los cuales se les llamo "péptidos activos" o péptidos funcionales.

Un péptido es definido como una cadena corta de aminoácidos, obtenida por hidrólisis de una proteína, cuyo componente básico son los aminoácidos. Durante la digestión de las proteínas, las enzimas proteolíticas gastrointestinales liberan péptidos, luego las peptidasas degradan los péptidos en aminoácidos que son absorbidos por la mucosa intestinal. No obstante, es sabido que algunos fragmentos son parcialmente resistentes a los procesos de hidrólisis, y una fracción de estos compuestos es susceptible de ser absorbida en cantidades fisiológicamente activas (Fox *et al.*, 1992; Tirelli *et al.*, 1997).

Los mecanismos de la absorción son poco conocidos y representan una fase clave en la comprensión del papel fisiológico de los péptidos, además de que su secuencia de aminoácidos resulta crucial para la actividad a desempeñar.

En general los péptidos funcionales son pequeños, excepto el Caseinomacropéptido (CMP), que contiene 64 aminoácidos, su reducido tamaño, sumado al hecho de que son hidrófobos explicaría su fácil absorción.

Por siglos, la leche ha sido considerada como alimento de consumo humano en particular para recién nacidos. Principalmente la atención se ha centrado en analizar si las proteínas de la leche como caseína, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y lactoferrina, tienen actividades biológicas adicionales a la nutrición (Lönnerdal, 2003).

Desde hace algunos años, varios autores han descrito péptidos bioactivos provenientes de las proteínas de la leche. Entre ellos se encuentran derivados de la caseína como las casomorfina, glicomacropéptidos y fosfopéptidos, casoxinas casokininas, casoplatelinas, isracidina e inmunopéptidos (Meisel y Bockelmann, 1999). Estos péptidos, pueden ser liberados por proteólisis enzimática como por ejemplo durante la digestión gastrointestinal o en el caso de los productos fermentados por acción proteasa del cultivo responsable de la fermentación.

Es interesante que algunos fragmentos son parcialmente resistentes a los procesos de hidrólisis, y una fracción de estos compuestos es susceptible de ser absorbida en cantidades fisiológicamente activas después de consumir leche o productos fermentados (Chabance, 1998). Una vez liberados pueden actuar como compuestos reguladores con actividad semejante a hormonas (Meisel, 1997). Se tiene un creciente interés en el estudio de la relación entre la nutrición e inmunidad, sustentados en la hipótesis de que algunos alimentos específicos puedan reducir susceptiblemente el establecimiento y/o la progresión de enfermedades inmunológicas (Kilara *et al.*, 2003). Lo cual eleva la posibilidad de que las proteínas de la leche puedan tener mayor importancia fisiológica como recurso potencial de péptidos biológicamente activos (Sandré *et al.*, 2001) que pueden ser usados en el tratamiento de algunas enfermedades.

Se ha demostrado que los péptidos activos de la leche tienen actividades biológicas muy variadas que van desde la actividad opioide, a ligar y transportar metales (Vegarud *et al.*, 2000), también son antihipertensivos, inmunomoduladores, antitrombóticos, antimicrobiales y protectores gástricos (Tabla 2).

Actividades Generales

La molécula completa de caseína tiene actividad inmunomoduladora, sin embargo también en el hidrolizado de caseína obtenido de la digestión en el tracto digestivo o de digestión enzimática *in vitro* se obtienen péptidos bioactivos incluyendo propiedades inmunomoduladoras (Gill *et al.*, 2000). Así se ha reportado que el hidrolizado enzimático de caseína inyectado en ubre de vaca tiene la capacidad de inducir la acumulación de granulocitos en el sitio de inyección (Shamay *et al.*, 2003), además de que los péptidos de caseína liberados en tracto digestivo activan la respuesta inmune (Lahov & Regelson, 1996; Chabance *et al.*, 1998).

Este conjunto de datos nos indica que las caseínas no sólo son una fuente de nutrientes sino que también liberan péptidos con potencial inmunomodulador. Se han aislado numerosos péptidos con acción inmunomoduladora comprobada *in vitro* e *in vivo*, pero de manera *in vivo*, se ha podido constatar que el fragmento de α -caseína, identificado bajo el nombre de isracidina protege a ratones y ovejas contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, además les hace desarrollar una inmunidad a largo plazo contra el riesgo de infección (Lahov *et al.*, 1996).

Se ha observado que ciertos fosfopéptidos derivados de la caseína bovina como el fragmento 59-79 de α -s₁-caseína y el fragmento 1-25 de β -caseína estimulan la producción de inmunoglobulinas en cultivos de células de bazo de ratón (Hata *et al.*, 1998). Este conjunto de datos indica que las caseínas así como los péptidos liberados en la digestión enzimática, tienen potencial inmunomodulador, sin embargo, se desconoce si los péptidos modulan la hematopoyesis tal y como lo hacen las caseínas.

El análisis del papel de los péptidos funcionales con efecto antimicrobiano, *in vitro*, se constató una inhibición del crecimiento de cepas patógenas en presencia de fragmentos de α -caseína (Tomita *et al.*, 1994; Zucht *et al.*, 1995).

El fragmento 165-203 de la α -caseína tiene propiedades antibacteriales y es conocido como Casocidina-1, este inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus* su actividad parece estar relacionada con su carga neta positiva (Zucht *et al.*, 1995), puesto que péptidos catiónicos matan a los microorganismos sensibles incrementando la permeabilidad de la membrana (Meisel, 1997).

Los péptidos antitrombóticos derivados de κ -caseína de la leche de vaca, llamados casoplatelinas, son inhibidores de la agregación de plaquetas, poseen una acción antitrombótica debido a que se han observado similitudes estructurales entre la cadena gamma del fibrinógeno y las secuencias peptídicas; por su analogía estructural, entran en competencia con la cadena gamma del fibrinógeno por los receptores de plaquetas, inhibiendo de esa forma su agregación (Jolles *et al.*, 1986).

Se ha detectado principalmente en secuencias de β -caseína y α -s₁-caseína bovina, péptidos con una acción antihipertensiva por inhibición competitiva de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la cual cataliza tanto la producción del vasoconstrictor angiotensina II y la inactivación del vasodilatador bradikinina (Yamamoto, 1997). En otros estudios, se ha notado un efecto de disminución de la presión arterial, por ejemplo, los péptidos procedentes de leche fermentada con *Lactobacillus helveticus*, ingeridos por ratas hipertensas, hicieron bajar su presión arterial. Así mismo, una sola dosis de leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* ingerida por ratas hipertensas a razón de 5 mL/Kg provocó una baja de la presión sistólica, mientras que no causó ningún efecto en ratas normales (Nakamura *et al.*, 1995). En el hombre se administró la misma leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* a sujetos hipertensos a razón de 95 mL diarios durante 8 semanas y se constató idéntico resultado, una reducción significativa de la presión sistólica respecto al grupo testigo que ingería leche acidificada a modo de placebo (Yamamoto, 1997).

El papel antitumoral de 90-95 α -casomorfina derivado de la α -caseína, de 1-5 β -casomorfina y de 1-7 β -casomorfina de la β -caseína ha sido mostrado *in vitro* disminuir la proliferación de líneas celulares de cáncer de seno y próstata (Kampa *et al.*, 1996; Hatzoglou *et al.*, 1996).

La acción de tipo opiáceo de algunos péptidos de la leche fueron las primeras propiedades descubiertas. En el hombre tras la ingestión de leche de vaca, se han detectado casomorfina en el contenido del intestino delgado (Svedberg *et al.*, 1985) además se encontraron péptidos con acción opiácea en el estómago y en el duodeno (Chabance *et al.*, 1998) pero aún no se les ha hallado en la fase siguiente, es decir en la sangre, tras una ingestión alimentaria. Cabe señalar que se ha observado la acción *in vitro* de los antagonistas opiáceos, es decir, opuesta a los efectos anteriores, con fragmentos de α -s₁-caseína fragmento 158-164 (exorfina ó casoxina D) (Teschmacher *et al.*, 1997; Meisel, 1997) y de κ -caseína llamadas casoxinas, estos corresponden a los fragmentos 25-34 (casoxina C), 35-41(casoxina A), y 58-61 de κ -caseína (casoxina B) (Chiba *et al.*, 1989). Por consiguiente, es posible obtener a partir de la misma proteína, péptidos con efecto inverso.

Secuencia peptídica	Fragmento	Nombre	Actividad Biológica
YFPFGPIPNLSL	β -CN(f60-70)	β -Casomorfina-11	Opioide
YFPFGPI	β -CN(f60-66)	β -Casomorfina-7	Opioide, Inhibidor de angiotensina
YFPFG	β -CN(f60-64)	β -Casomorfina-5	Opioide
YVPXP	α_S -CN(f158-162)	α_{S1} -Casomorfina	Opioide
RYLGYL	α_{S1} -CN(f90-95)	α -caseína	Opioide
RYLGYLE	α_{S1} -CN(f90-96)	α -caseína	Opioide
YGLF	α -LA(f50-53)	α -Lactorfina	Opioide, Inhibidor de angiotensina
YLLF	β -LG(f102-105)	β -Lactorfina	Opioide, Inhibidor de angiotensina
YGFQNA	SA(f399-404)	Serorfina	Opioide
SRYPY.SCH ₃	κ -CN(f33-38)	Casoxina 6	Antagonista Opioide
YIPIQYVLSR	κ -CN(f25-34)	Casoxina C	Antagonista Opioide
YL	β -LG(f102-103)	Lactokinina	Inhibidor de angiotensina
ALPMHIR	β -LG(f142-148)	Lactokinina	Inhibidor de angiotensina
VPP	β -CN(f84-86)	β -Casokinina	Inhibidor de angiotensina
IPP	β -CN(f74-76)	β -Casokinina	Inhibidor de angiotensina
AVPYPQR	β -CN(f177-183)	β -Casokinina-7	Inhibidor de angiotensina
FFVAPFPEVFGK	α_{S1} -CN(f23-34)	α_{S1} -Casokinina	Inhibidor de angiotensina
FFVAP	α_{S1} -CN(f23-27)	α_{S1} -Casokinina-5	Inhibidor de angiotensina
FPEVFGK	α_{S1} -CN(f28-34)	α_{S1} -Casokinina-7	Inhibidor de angiotensina
VAP	α_{S1} -CN(f25-27)	α_{S1} -Casokinina	Inhibidor de angiotensina
YQQPVLGPVR	β -CN(f193-202)	β -Casokinina-10	Inhibidor de angiotensina, Inmunomodulador
TTMPLW	α_{S1} -CN(f194-199)	α_{S1} - Inmunocasokinina	Inhibidor de angiotensina, Inmunomodulador
PGPIP	β -CN(f63-68)	Inmunopéptido	Inmunomodulador
LLY	β -CN(f191-193)	Inmunopéptido	Inmunomodulador
YG	α -LA(f50-51) (f18-19)	κ -CN(f38-39)	Inhibidor de angiotensina, Inmunomodulador
YGG	α -LA(f18-20)	Inmunopéptido	Inmunopéptido
RELEELNVPGEIVES*LS*S*S*EESITR	β -CN(f1-25)4P	Caseinofosfopéptido	Ligar Calcio
DIGS*ES*TEDQAMEDIM	α_{S1} -CN(f43-58)2P	Caseinofosfopéptido	Ligar Calcio
QMEAES*IS*S*S*EEIVPNS*VEQK	α_{S1} -CN(f59-79)5P	Caseinofosfopéptido	Ligar Calcio
FKCRRWQRMKKGAPSITCVRRAF	LF(f17-41)	Lactoferrina	Antimicrobiano
MAIPPKKNQDK	κ -CN(f106-116)	Casoplatelina	Antitrombótico

Fosfoserina = S*

Tabla 2. Ejemplo de péptidos bioactivos encontrados en las proteínas de la leche. (Adaptado de Meisel, 1999).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CasNa es una sal de la caseína y tiene la capacidad de modular la proliferación y diferenciación de las líneas celulares 32D y WEHI-3, además de inducir la acumulación de granulocitos *in vivo* en el sitio de inyección (Santiago, 1994). Cuando la caseína es expuesta a enzimas proteolíticas, se obtiene un hidrolizado de caseína, y este hidrolizado también induce la acumulación de granulocitos en el sitio de inyección (Shamay *et al.*, 2003), lo cual sugiere que el CasNa y el hidrolizado de caseína pudieran tener un efecto biológico similar, incluyendo la modulación de la hematopoyesis. Además de que los péptidos de caseína liberados en tracto digestivo activan la respuesta inmune (Lahov y Regelson, 1996; Chabance *et al.*, 1998). Este conjunto de datos indica que las caseínas así como los péptidos liberados en la digestión enzimática, tienen potencial inmunomodulador, sin embargo, se desconoce si los péptidos modulan la hematopoyesis al nivel como lo hacen las caseínas.

Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende mostrar que el hidrolizado de caseína, al igual que el CasNa bloquea la proliferación e induce diferenciación de las células 32D y WEHI-3. Adicionalmente se explora la posibilidad de que los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 obtenidos de κ -caseína pueden ser algunos de los responsables del bloqueo de la proliferación e inductores de la diferenciación contenidos en el hidrolizado de caseína. Este estudio no solo es importante porque se amplía el conocimiento básico sobre la regulación de la hematopoyesis, sino que también puede proporcionar información útil para relacionar proteína dietética con la respuesta inmune, lo cual se puede reflejar en la salud de los individuos y ayudar a encontrar alternativas para solucionar los problemas de una hematopoyesis anormal.

HIPÓTESIS

Las caseínas y el caseinato de sodio (CasNa) inhiben la proliferación de la línea hematopoyética multipotencial 32D y de la línea leucémica mielomonocítica WEHI-3, ambas de ratón.

Se sabe que el hidrolizado de caseína puede activar el sistema inmune, por lo que, se espera que el hidrolizado de caseína también module la proliferación y diferenciación de las células 32D y WEHI-3, sin afectar su viabilidad tal y como lo hace el CasNa, de igual manera se espera que los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 provenientes de la secuencia de aminoácidos de la κ -caseína, pudieran modular la hematopoyesis.

OBJETIVOS

General:

Evaluar la participación del hidrolizado de caseína (HC) y los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína como moduladores de la proliferación y diferenciación en la línea celular mieloide normal 32D y la línea leucémica WEHI-3.

Particulares:

- Evaluar el efecto del HC en la proliferación de las células 32D y WEHI-3.

- Evaluar el efecto de los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína en la proliferación de las células 32D y WEHI-3.

- Evaluar la viabilidad de las células 32D y WEHI-3 tratadas con HC, CasNa y los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína.

- Determinar si el HC, CasNa y los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína inducen diferenciación de las células 32D y WEHI-3.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Líneas celulares.

En este trabajo se empleó la línea hematopoyética mieloide multipotencial de ratón 32D dependiente de Interleucina-3 (IL-3), la cual fue donada por la Dra. T. Hoang (Laboratory of Hematopoyesis and Leukemia, Montreal Canadá.). Las células se cultivaron en medio Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM) (Gibco BRL NY, USA) (Apéndice A), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) previamente inactivado a 56°C (HyClone UTA, USA) (Apéndice A), adicionando 0.5 ng/mL de IL-3 recombinante de ratón (rmIL-3) (R&D System, Minneapolis, USA) (Apéndice A), a una temperatura de 37°C, en una atmósfera al 5% de CO₂ (Freshney R, 1994). Cada resiembra se realizó con 1×10^5 células/mL, en cajas Petri (Fisher Brand, Denmark) cada 48 horas. La línea leucémica mielomonocítica de ratón WEHI-3, fue adquirida en la American Type Culture Collection TIB-68 (ATCC TIB-68), se cultivó bajo las mismas condiciones que la línea 32D a excepción de la adición de IL-3, pero suplementada con β -mercaptoetanol 0.05 mM, resembrada a una densidad de 3×10^4 células/mL, cada 48 horas.

B. Cultivos bajo tratamiento de las células 32D y WEHI-3.

Para evaluar el efecto del hidrolizado de caseína (HC) (Sigma, USA) y el caseinato de sodio (CasNa) (Difco Lab., Detroit, Michigan USA), primero se prepararon las soluciones, solubilizando al CasNa y el HC en PBS (Buffer de fosfatos) (Apéndice A), al 10% (p/v), posteriormente se esterilizaron por medio de autoclave. Los cultivos celulares se realizaron en placas de 96 pozos fondo plano (Corning NY, USA), con una densidad inicial de 2×10^4 células/mL e IL-3 [0.5ng/mL], todo bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, posteriormente se adicionaron diferentes dosis de hidrolizado de caseína o CasNa y se incubó por 72 horas, además se incluyeron cultivos con 4 microlitros (μ L) de PBS (como control del experimento), con cuatro repeticiones por condición. Una vez transcurrido el tiempo se evaluó la proliferación celular.

En el caso de las células WEHI-3, los cultivos celulares se realizaron en placas de 24 pozos fondo plano, tratadas para ultra no-adherencia (Corning NY, USA), con una densidad inicial de 2×10^3 células/mL y suplementada con β -mercaptoetanol (0.05 mM), utilizando diferentes dosis de CasNa e hidrolizado de caseína, bajo las mismas condiciones de cultivo y tiempo de 72 horas de incubación. Para evaluar el efecto del hidrolizado de caseína y del CasNa en la proliferación de las células 32D y WEHI-3, se estimó el número celular por conteo directo de cada ensayo, se resuspendió y se tomó una alícuota que posteriormente se colocó en una cámara de Neubauer, para evaluar el número celular bajo un microscópico de luz (Carl Zeiss), estimando así la densidad celular. Paralelamente se determinó la viabilidad celular por la técnica de exclusión al azul tripano (Sigma, USA), utilizando una porción 1:1 de colorante y de muestra celular, para proceder a evaluar la diferencia entre células muertas y vivas (Una célula viable tendrá el citoplasma refringente mientras que una célula no viable tendrá el citoplasma azul). El efecto en la proliferación celular fue confirmado con incorporación de timidina tritiada.

Efecto de los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína en las células 32D y WEHI-3.

Para evaluar el efecto de los péptidos de κ -caseína, (Sigma USA) (Tabla 2), primero se prepararon las soluciones solubilizando los péptidos de κ -caseína en PBS, para obtener una concentración stock de 50 mM, posteriormente se esterilizaron mediante radiación con Cesio-137 (Cs-137) a 10,000 rads por espacio de 27 minutos.

Los cultivos celulares se realizaron en placas de 96 pozos fondo plano (Corning NY, USA), con una densidad inicial de 2×10^4 células/mL en células 32D e IL-3 a [0.5 ng/mL], todo bajo las condiciones de cultivo antes empleadas, se realizaron ensayos de curvas dosis-respuesta, por lo que las concentraciones de péptidos aplicadas en los ensayos, fueron: de [0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM] para el fragmento 58-61 de κ -caseína una vez transcurrido el tiempo se evaluó el número celular mediante un Hemocitómetro, en el caso de los fragmentos 25-34 y 35-41 de κ -caseína se empleó un rango de concentraciones de [0.0, 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 mM], (El cero significa el cultivo control, condicionado con vehículo (PBS), la evaluación se realizó mediante la incorporación de ^3H -timidina.

El tiempo de cultivo fue de 72 horas en ambas líneas celulares, y se incluyeron cultivos con 4 μ L de PBS, los ensayos tuvieron cuatro repeticiones por condición.

En el caso de las células WEHI-3, los cultivos celulares se realizaron en placas de 96 pozos fondo plano (Corning NY, USA), con una densidad inicial de 2×10^3 células/mL y suplementada con β -mercaptoetanol 0.05 mM, utilizando las mismas dosis aplicadas para las células 32D, y empleando las mismas condiciones de cultivo antes mencionadas y 72 horas de incubación. Para evaluar el efecto de los péptidos en la proliferación de las células WEHI-3, se estimó el número celular por conteo directo para el péptido fragmento 58-61 de κ -caseína; y la incorporación de 3 H-timidita para los fragmentos peptídicos 25-34 y 35-41 de κ -caseína.

Descripción de los péptidos de κ -caseína utilizados:

	Péptido	Peso Molecular	Carácter
Fragmento 25-34 de κ-caseína	YIPIQYVLSR	1251.47 D	—
Fragmento 35-41 de κ-caseína	YPSYGLNY	976.03 D	—
Fragmento 58-61 de κ-caseína	YPYY	604.64 D	ácido

Tabla 3. Características de los péptidos de κ -caseína (Sigma USA) utilizados en los ensayos.

Incorporación de [³H]-timidita

La cuantificación de la incorporación de ³H-timidita [Thymidine (Methyl³-H) KR AMTMANN DF. México] se utilizó como otro parámetro para evaluar la proliferación celular. Al segundo día de cultivo de las células 32D y WEHI-3 tratadas con los péptidos de k-caseína, se adicionó a los cultivos 1 μCi de ³H-timidina, diluyendo 1 μCi/mL de ³H timidina en Iscove's y SFB, colocando 20 μL de esta solución de ³H-timidina, en cada pozo, se retornó la placa a la incubadora; después de 18 horas adicionales las células fueron congeladas a -70°C, después la placa se pasa a la incubadora para descongelar, se repitió este procedimiento una vez más, con la finalidad de lizar las células y obtener los núcleos, posteriormente se cosecharon las muestras sobre papel de fibra de vidrio Whatman utilizando un cosechador de células, aspirando y lavando varias veces las muestras con agua destilada para que se elimine la ³H-timidina no incorporada, se dejó secar a temperatura ambiente los papeles y posteriormente, se colocó cada uno en un vial con 2 mL de líquido de centelleo (Beckman CA, USA) y se procedió a hacer la lectura de la radioactividad incorporada (CPM) en un contador de emisiones beta (Beckman LS6500, USA).

C. Evaluaciones de la Diferenciación Morfológica

La diferenciación morfológica se evaluó después de realizar frotis de las muestras sobre portaobjetos, posteriormente las células se fijan con metanol absoluto, y se procede a teñir con el colorante Giemsa al 10% (Sigma Co. USA) (Apéndice B) por 15 minutos y después se enjuagó con agua, posteriormente se determinó la morfología diferenciando los blastos de los linajes monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo por su tamaño, forma del núcleo y la proporción núcleo-citoplasma (Mc Donal, 1995).

D. Tinciones Citoquímicas específicas

Para determinar con mayor precisión los linajes celulares, se realizó la técnica de tinción citoquímica específica para el linaje monocito-macrófago con alfa-naftil acetato esterasa (Apéndice C) y para el linaje granulocito-neutrófilo con cloroacetato esterasa (Apéndice D) (Li *et al.*, 1973). El criterio utilizado para la determinación de cada linaje fue, positivo para las células que presentaron el color característico de la tinción ó, negativo para las que no lo presentaron.

E. Expresión de antígenos de superficie.

Citometría de Flujo: Además de las evaluaciones morfológicas y citoquímicas se determinó la diferenciación mediante la aparición de antígenos de superficie característicos del linaje monocito-macrófago y del linaje granulocito-neutrófilo empleando la citometría de flujo.

Se utilizó el anticuerpo anti-Fms [(CSF-1R) extracelular domian] que reconoce un dominio extracelular del receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos (MCSFR), una molécula que se expresa sólo en células del linaje monocito-macrófago, y el anticuerpo anti-Gr-1 que reconoce a un epítipo de Ly-6G, cuya expresión está directamente relacionada con la diferenciación granulocítica. Inicialmente se evaluó la especificidad de los anticuerpos, en células de cavidad peritoneal de ratones CD-1 (macrófagos residentes de cavidad peritoneal) para el anticuerpo anti-Fms y células de médula ósea (células granulocíticas) para el anticuerpo Gr-1, se empleó para cada anticuerpo un control de isotipo. Luego se cuantificó la fluorescencia de las células sin anticuerpo (fluorescencia propia), con el isotipo y en presencia de cada anticuerpo específico.

Detección del antígeno de superficie específico para macrófagos.

a) Una vez transcurrido el tiempo de cultivo las células de cada tratamiento se colectaron en tubos eppendorf y se centrifugó 6 minutos, el botón se lavó, después se adicionó el anticuerpo **anti-Fms** [(CSF-1R) extracelular domian (rabbit antisuerum) (UPSTATE NY, USA)] que reconoce al receptor del M-CSF presente en macrófagos y monocitos, o también se adicionó el control de isotipo [IgG de conejo (Normal rabbit IgG) (UPSTATE NY, USA)] (diluidos 1:200) a las células y se incubó por 30 minutos a 4°C (El control de isotipo se adicionó a una muestra positiva) posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS-SFB al 2%. Y después se adicionó el anticuerpo secundario [Goat anti-rabbit IgG fluorescein (FITC) conjugated (ZYMED, San Francisco CA, USA)], (diluido 1:200) a todas las muestras, y de igual manera se incubó 30 minutos a 4°C, se lavó dos veces. La cuantificación se realizó en un citómetro de flujo (FACS Calibur), para la lectura de las muestras se empleó PBS-SFB al 2% y se evaluaron 10,000 eventos.

Detección del antígeno de superficie específico para granulocitos.

b) Transcurrido el tiempo de cultivo se colectaron las células y se centrifugó por 6 minutos, después se adicionó el anticuerpo **Gr-1** [(FITC-conjugated rat anti-mouse Ly-6G and Ly-6C) (BD Biosciences Pharmigen San Diego CA, USA)] que reconoce al antígeno Gr-1 expresado en granulocitos, y también se adicionó el control de isotipo (FITC-conjugated rat IgG_{2b,k}) (BD Biosciences Pharmigen San Diego CA, USA) (diluidos 1:200), se incubó 30 minutos a 4°C (el control de isotipo se adicionó a una muestra del positivo), posteriormente se lavó dos veces con PBS-SFB al 2%, y se cuantificó. Para la lectura de las muestras se empleó PBS-SFB al 2%. Se evaluaròn 10,000 eventos.

Manejo de Datos y Análisis Estadístico

Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces de manera independiente, con cuatro repeticiones cada uno, Las evaluaciones morfológicas y citoquímicas se realizaron por triplicado, con al menos dos repeticiones cada uno. Todos los datos obtenidos se analizaron por un Análisis de Varianza (ANOVA), después las medias se compararon para obtener la diferencia significativa mediante la prueba de Tukey y la prueba de Dunnett, ($p < 0.05$), se realizó empleando el programa SPSS (versión 11.0) estándar para Windows (2001).

RESULTADOS

Bloqueo de la proliferación celular por el HC.

Para evaluar el comportamiento del CasNa e HC en la proliferación de la línea celular mieloide 32D y de la línea leucémica WEHI-3, se realizaron ensayos dosis-respuesta en presencia de CasNa e HC y después de 72 horas de cultivo se evaluó el número celular. Los datos obtenidos indican que el CasNa e HC reducen significativamente ($p < 0.05$) y en forma dosis-dependiente la proliferación de las células 32D a partir de 0.5 mg/mL, (Fig. 2-A, 3-A). En cuanto a WEHI-3, los resultados indican que el efecto en la proliferación de CasNa e HC es a partir de 1 mg/mL de manera significativa respecto al control ($p < 0.05$) (Fig. 4-A, 5-A).

La inhibición de la proliferación no es consecuencia de muerte celular.

El bloqueo en la proliferación puede ser consecuencia de citotoxicidad por parte de estas moléculas, para descartar esta posibilidad las células fueron evaluadas por la técnica de exclusión al azul tripano, un colorante el cual se incorpora en las células muertas. Los resultados indican que ninguno de los dos tratamientos alteran la viabilidad celular a dosis menores o iguales de 2 mg/mL, ya que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, en ambas líneas celulares; células 32D (Fig. 2-B, 3-B); células WEHI-3 (Fig. 4-B, 5-B). La viabilidad sólo es afectada significativamente respecto al control, con la dosis de 4 mg/mL, aunque fue superior al 90% independientemente del tratamiento.

Conociendo que la dosis de 2 mg/mL de CasNa o HC no afecta la viabilidad celular, se procedió a usar esta dosis para confirmar el bloqueo de la proliferación por ensayos de incorporación de ^3H -timidina. Los resultados confirman que ambos compuestos bloquean la proliferación de las células 32D y WEHI-3 (Fig. 6-A, B).

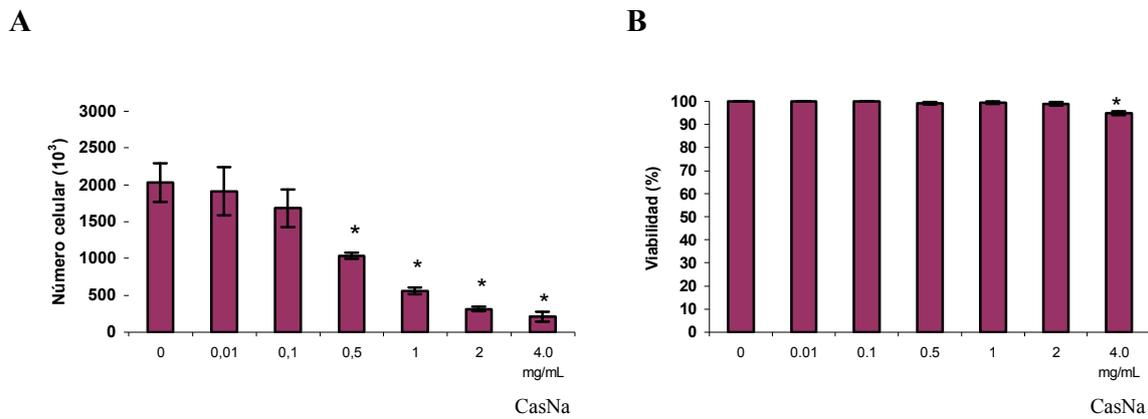


Figura 2. Efecto dosis-respuesta del Caseinato de Sodio (CasNa) en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular 32D, evaluada por conteo directo y exclusión al azul tripano, después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), Caseinato de Sodio (CasNa) [0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL]. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$).

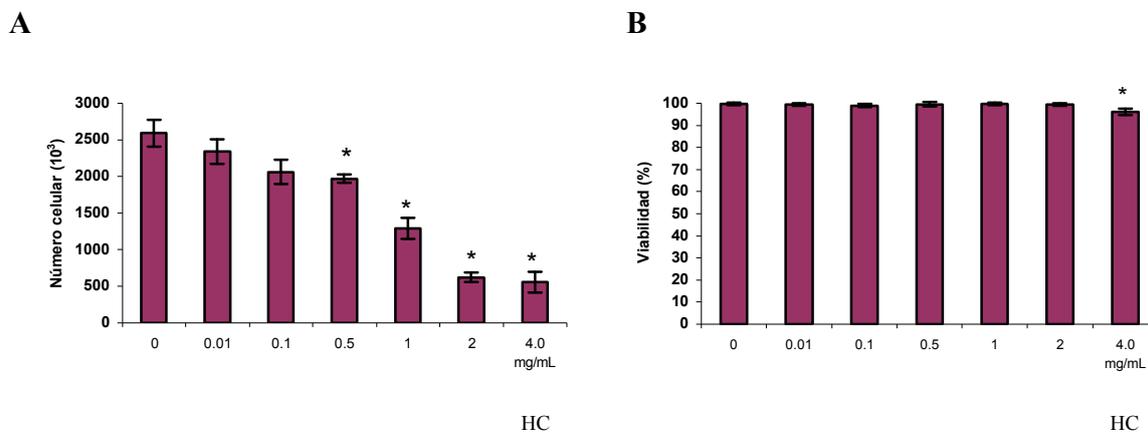


Figura 3. Efecto dosis-respuesta del Hidrolizado de caseína (HC) en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular 32D, evaluada por conteo directo y exclusión al azul tripano, después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), Hidrolizado de caseína (HC) [0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL]. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$).

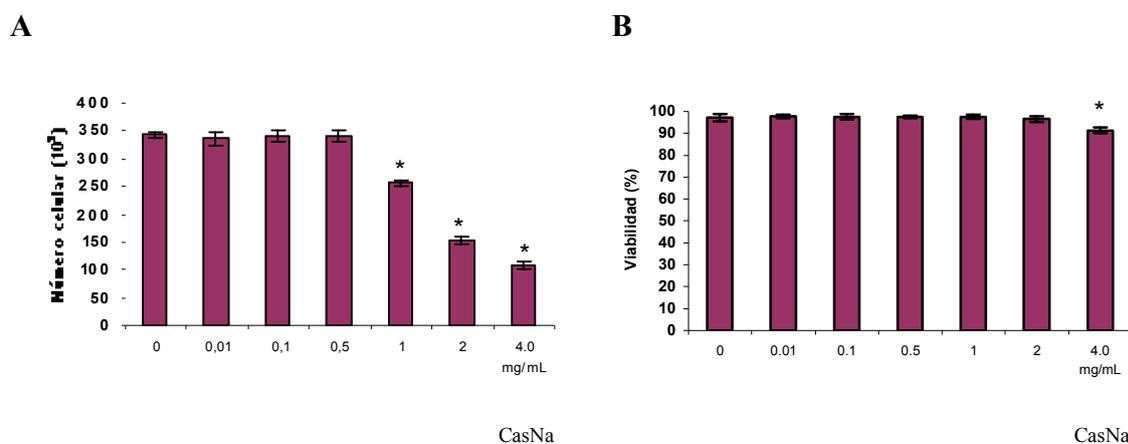


Figura 4. Efecto dosis-respuesta del Caseinato de Sodio (CasNa) en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular WEHI-3, evaluada por conteo directo y exclusión al azul tripano, después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), Caseinato de Sodio (CasNa) [0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL]. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$).

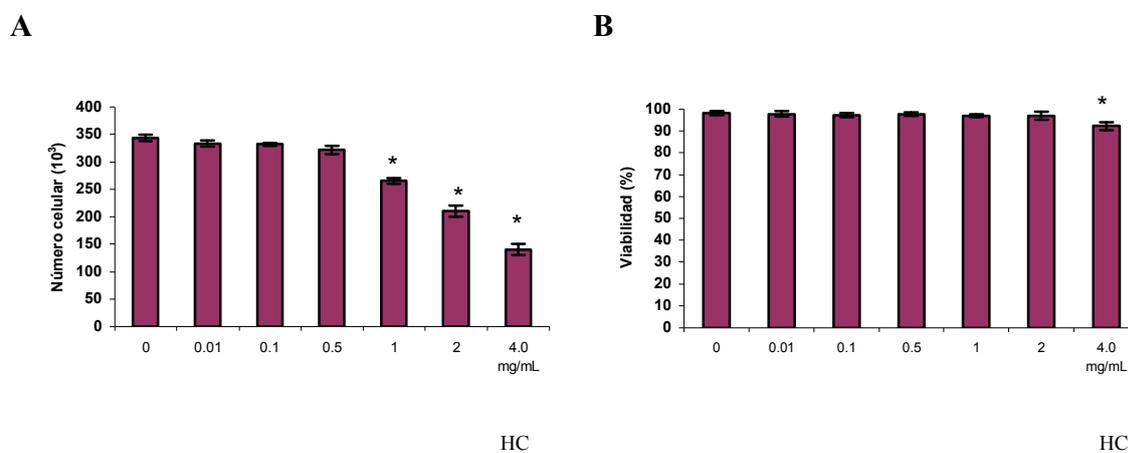


Figura 5. Efecto dosis-respuesta del Hidrolizado de caseína (HC) en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular WEHI-3, evaluada por conteo directo y exclusión al azul tripano, después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), Hidrolizado de caseína (HC) [0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/mL]. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$).

A) Células 32D

B) Células WEHI-3

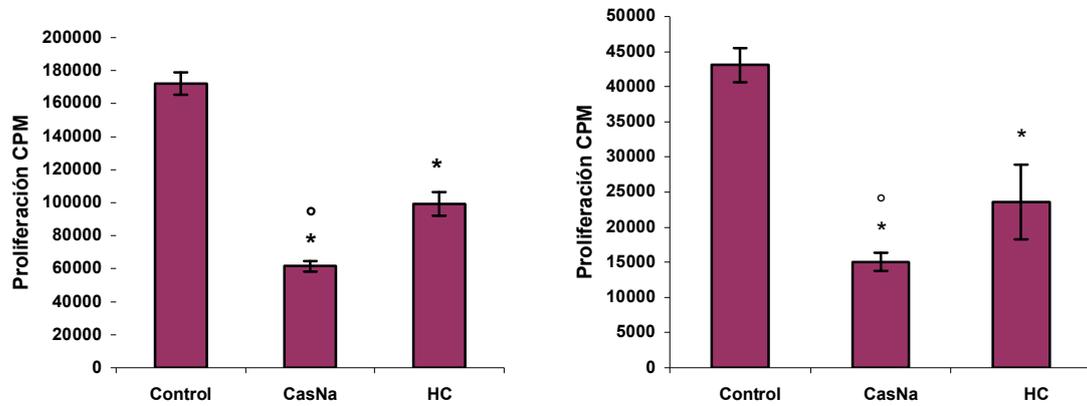


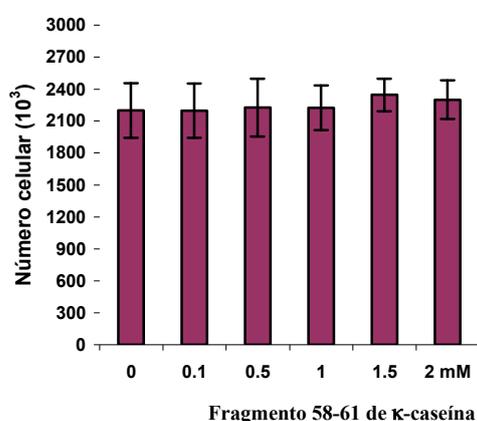
Figura 6. Efecto del Caseinato de Sodio (CasNa) e Hidrolizado de caseína (HC) en la proliferación de la línea celular 32D y WEHI-3, a una dosis de 2 mg/mL, evaluada por incorporación de ^3H -Timidina, después de 72 horas de cultivo. Control (con vehículo), Caseinato de Sodio (CasNa), Hidrolizado de caseína (HC). *° Diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos y respecto al control ($p < 0.05$).

Efecto de los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína en la proliferación de células 32D y WEHI-3.

Para determinar si se afecta la proliferación de las células 32D y WEHI-3 en presencia de los péptidos de κ -caseína se realizaron ensayos dosis-respuesta, abarcando un rango de concentraciones de [0.0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM] para el fragmento 58-61 de κ -caseína, una vez transcurrido el tiempo de cultivo se evaluó el número celular mediante un Hemocitómetro; para los fragmento 25-34 y 35-41 de κ -caseína se empleó un rango de concentraciones de [0.0, 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 mM], la evaluación se realizó mediante la incorporación de ^3H -timidina. El tiempo de cultivo fue de 72 horas en ambas líneas celulares.

Para el péptido fragmento 58-61 de κ -caseína los datos indican que no tiene efecto en la proliferación celular respecto al control con vehículo, en células 32D (Fig.7-A). Para las células WEHI-3 tampoco mostró efecto en la proliferación celular (Fig.8-A) ($p < 0.05$), la viabilidad no se ve modificada en ambas líneas celulares (Fig.7-B y 8-B) ($p < 0.05$).

A



B

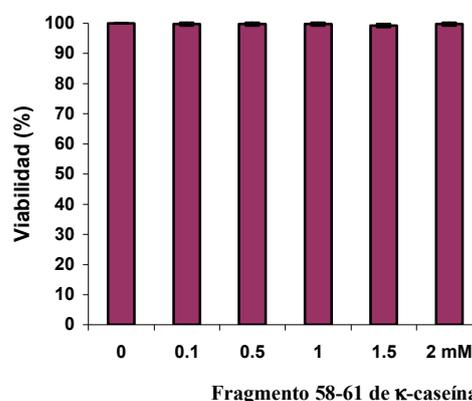


Figura 7. Curva dosis respuesta de efecto del fragmento 58-61 de κ -caseína en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular 32D, evaluada por conteo directo después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), fragmento 58-61 de κ -caseína [0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM], ($p < 0.05$) respecto al control.

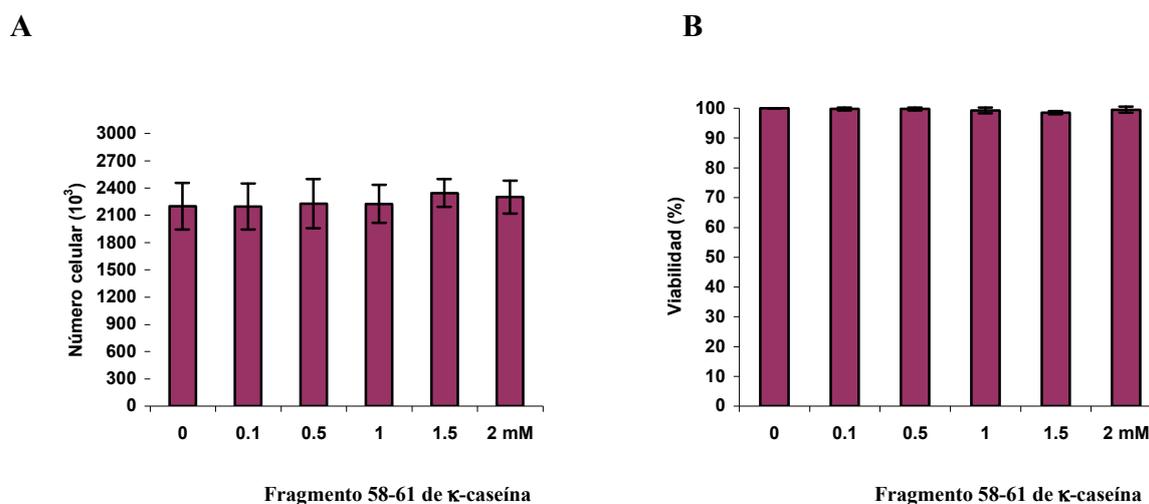


Figura 8. Curva dosis respuesta de efecto del fragmento 58-61 de κ -caseína en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular WEHI-3, evaluada por conteo directo después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), fragmento 58-61 de κ -caseína [0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mM], ($p < 0.05$) respecto al control.

El fragmento peptídico 25-34 de κ -caseína, afectó significativamente la proliferación de las células 32D (59.9% de proliferación respecto al control y entre los demás tratamientos) al emplear la dosis de 1 mM (Fig.9-A) ($p < 0.05$), sin afectar la viabilidad celular ($p < 0.05$) (Fig. 9-B). Para el caso de las células WEHI-3 tratadas con este péptido indican que el efecto en la proliferación es mayor a la que presentan las células 32D ya que muestra un porcentaje de solo un 33.2 % de proliferación respecto al control (Fig.10-A), diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), sin afectar la viabilidad celular ($p < 0.05$) (Fig.10-B), utilizando la misma concentración de 1 mM que se utilizó para las células 32D.

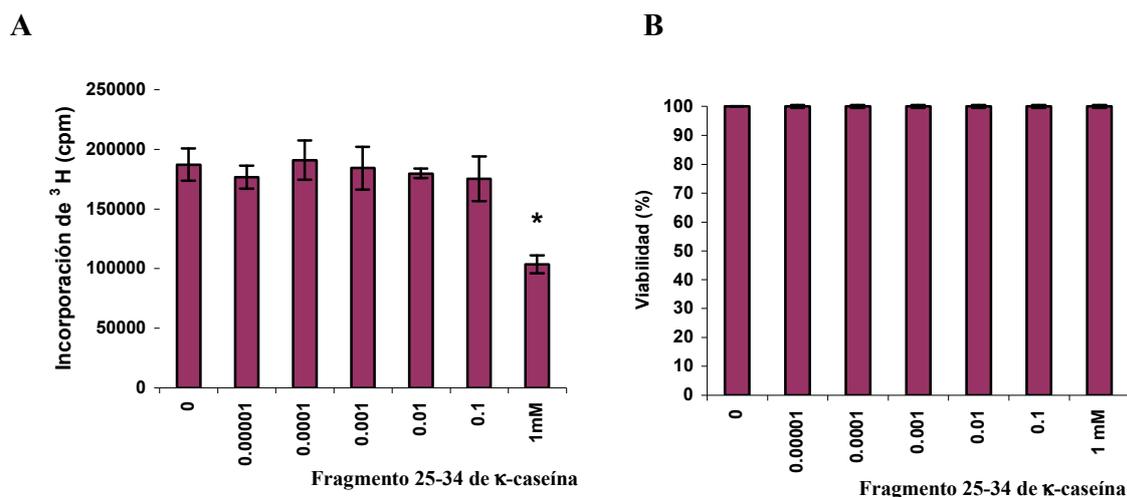


Figura 9. Curva dosis respuesta de efecto del fragmento 25-34 de κ -caseína en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular 32D, evaluada por incorporación de ^3H -timidina, después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), fragmento 25-34 de κ -caseína [0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 mM]. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

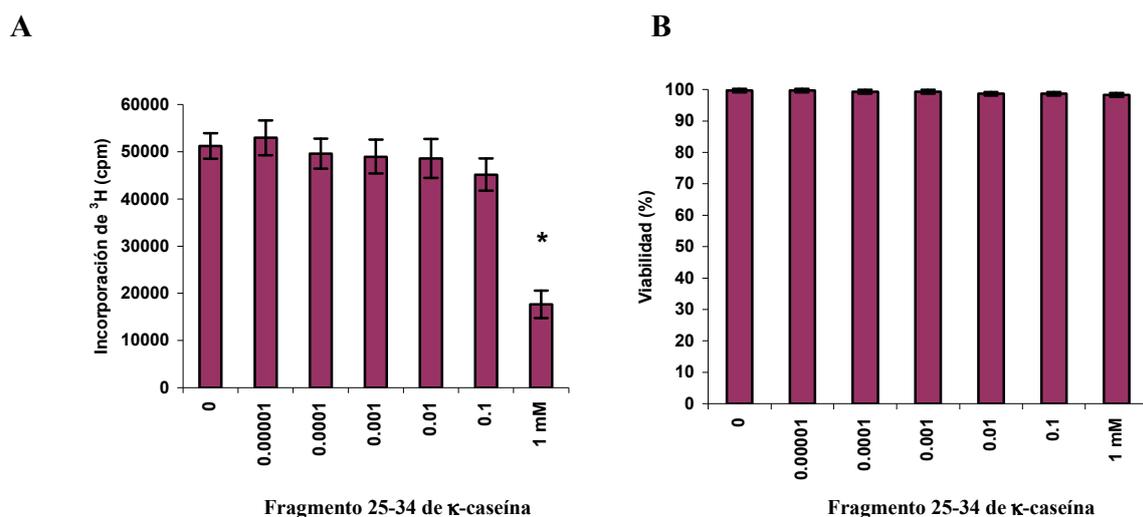


Figura 10. Curva dosis respuesta de efecto del fragmento 25-34 de κ -caseína en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular WEHI-3, evaluada por incorporación de ^3H -timidina, después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), fragmento 25-34 de κ -caseína [0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 mM]. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

El fragmento peptídico 35-41 de κ -caseína muestra un efecto marginal pero significativo ($p < 0.05$) en las células 32D respecto al control al emplear la dosis de 0.1 y 1 mM (Fig.11-A), sin afectar la viabilidad celular ($p < 0.05$) (Fig.11-B). Para las células WEHI-3 tratadas con este péptido indican que el efecto en la proliferación tuvo menos efecto que en las células 32D ya que

muestra un porcentaje de 83.71 % de proliferación con la dosis de 1 mM, respecto al control (Fig.12-A) diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), sin afectar la viabilidad celular ($p < 0.05$) (Fig.12-B).

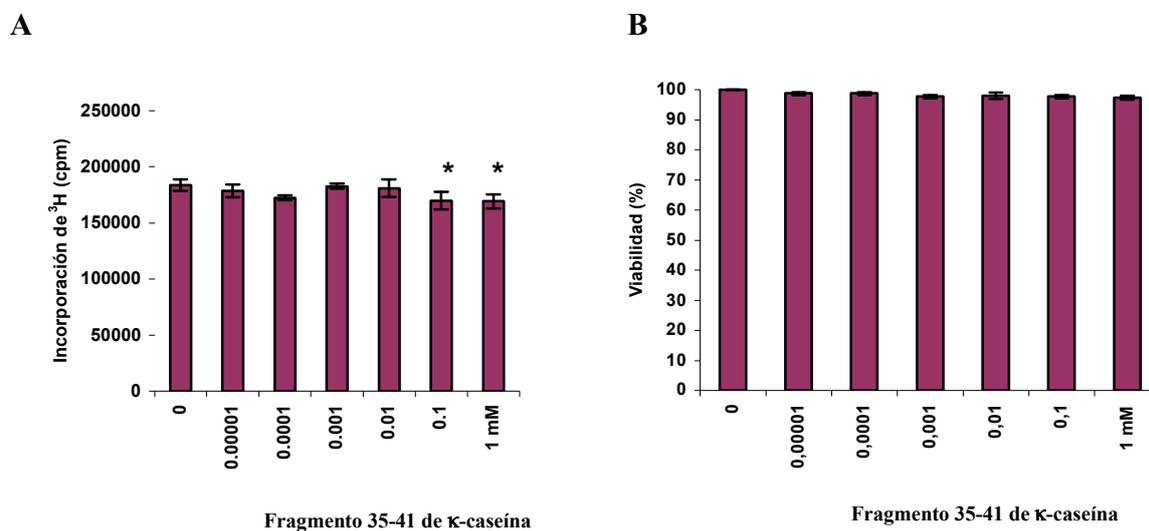


Figura 11. Curva dosis respuesta de efecto del fragmento 35-41 de κ -caseína en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular 32D, evaluada por incorporación de ³H-timidina, después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), fragmento 35-41 κ -caseína [0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 mM] * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

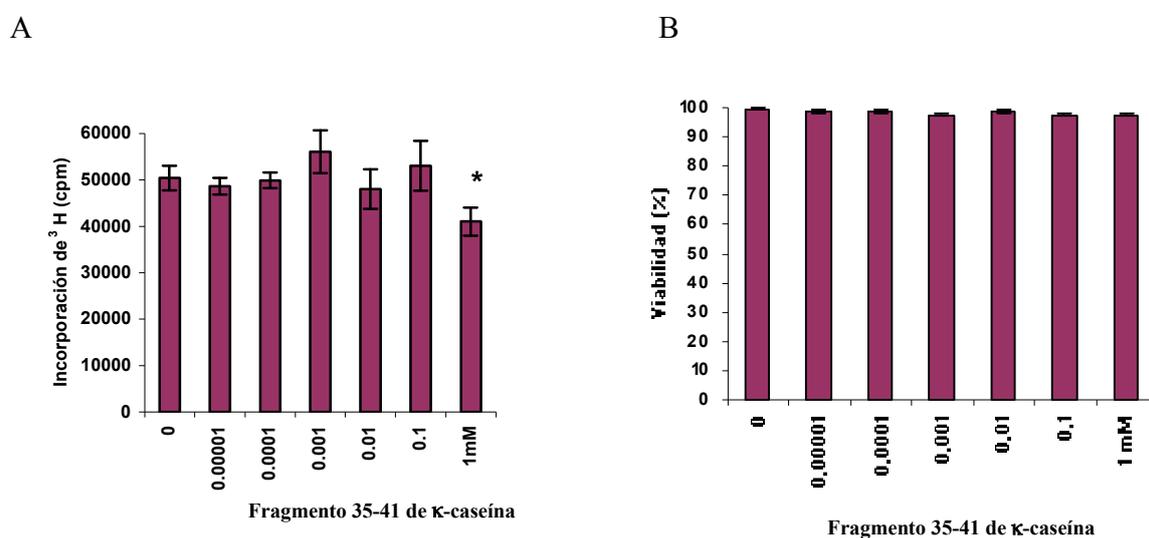


Figura 12. Curva dosis respuesta de efecto del fragmento 35-41 de κ -caseína en la proliferación (A) y viabilidad (B) de la línea celular WEHI-3, evaluada por incorporación de ³H-timidina, después de 72 horas de cultivo. Control con vehículo (0), fragmento 35-41 de κ -caseína [0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 mM]. *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

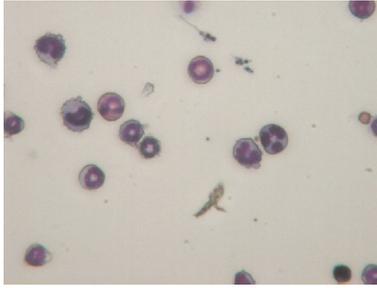
Efecto de CasNa, Hidrolizado de caseína y péptidos de κ -caseína en la diferenciación de células 32D y WEHI-3.

Evaluación Morfológica.

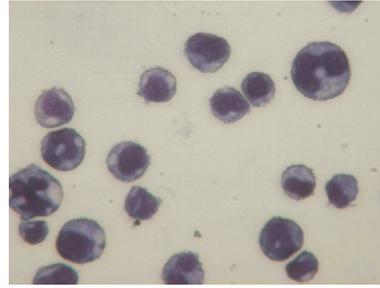
Una célula bajo el estímulo de ciertos factores puede diferenciarse (Sachs, 1996). El bajo índice de proliferación puede ser resultado de una diferenciación de las células hacia algún linaje (Lee R. *et al.*, 1998), por lo anterior, se evaluó la morfología en las células mediante tinciones con Giemsa, utilizando las mismas concentraciones empleadas, que tuvieron efecto en la proliferación pero, no en la viabilidad, por lo que el CasNa y el hidrolizado de caseína se empleó a 2 mg/mL y los péptidos con 1mM tanto para las células 32D como para las células WEHI-3. Las evaluaciones se realizaron comparando los tratamientos con respecto al control, obteniendo los porcentajes de diferenciación de las células. El criterio de evaluación fue el tamaño y la forma del núcleo, tomando en cuenta la relación núcleo citoplasma y características del citoplasma.

Los resultados muestran que los cultivos control en las células 32D presentan un porcentaje mayor al 92% de blastos, al ser tratadas con HC un 20% de las células presentan características del linaje monocito-macrófago, y 8% corresponden al linaje granulocito-neutrófilo, al tratarlas con CasNa el 37%, presentan características del linaje monocito-macrófago y 2% del linaje granulocito-neutrófilo (Fig.13, Tabla 4-A). Para el caso de las células WEHI-3 las evaluaciones muestran un 85.5% de células blásticas, pero al ser tratadas con CasNa el 15.9% de las células tienen características del linaje monocito-macrófago y 11.5% del linaje granulocito-neutrófilo. En cuanto a HC se muestra un 17.2% del linaje monocito-macrófago y un 10.5% del linaje granulocito-neutrófilo (Fig.14, Tabla 4-B).

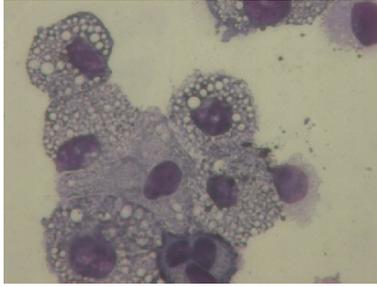
En cuanto a los péptidos solo se observó que las células 32D en presencia del fragmento 25-34 de κ -caseína presenta una inducción de la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago (Fig.13) (Tabla 4-A).



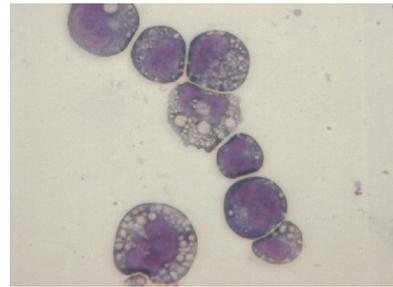
A) Células en Banda de médula ósea de ratón



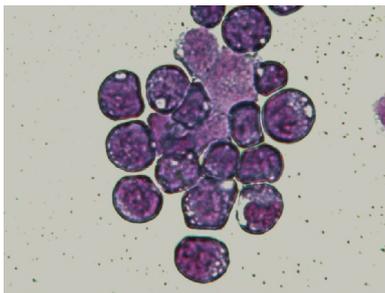
E) Hidrolizado de caseína



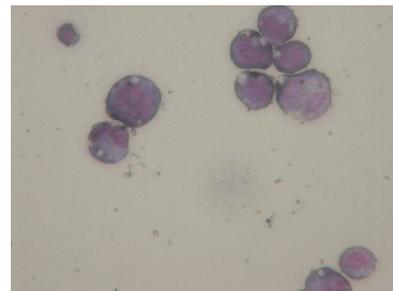
B) Células J774



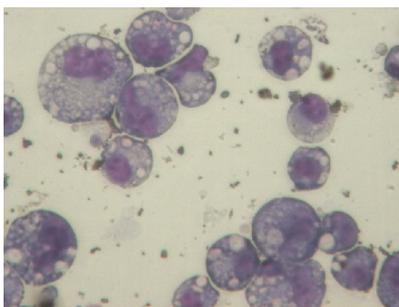
F) Fragmento 25-34 de κ -caseína



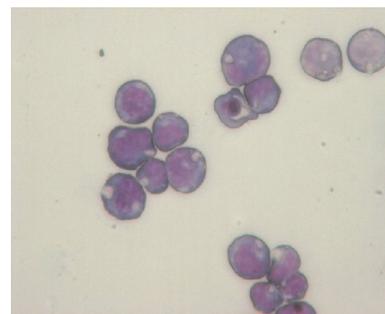
C) Células 32D control con vehículo



G) Fragmento 35-41 de κ -caseína

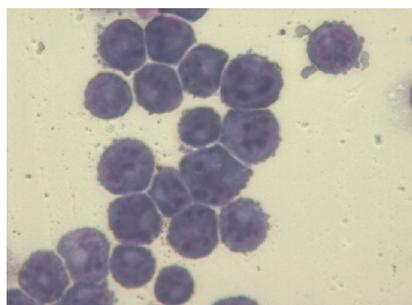


D) CasNa

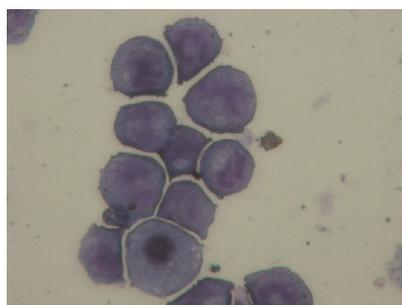


H) Fragmento 58-61 de κ -caseína

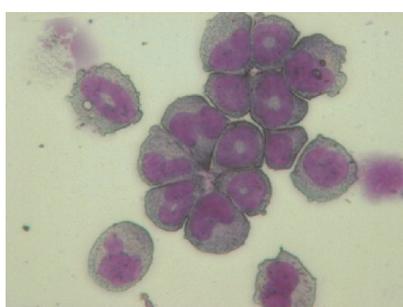
Figura 13. **Morfología de las células 32D** (400X), en presencia de CasNa, Hidrolizado de caseína y péptidos de κ -caseína. Las células fueron cultivadas por 72 horas y teñidas con **Giemsa**. Células en Banda (A), Células J-774 (B); Células 32D con solo vehículo (C) como controles. Células 32D tratadas con CasNa (D), con Hidrolizado de caseína (E), con fragmento 25-34 de κ -caseína (F), con fragmento 35-41 de κ -caseína (G) y con fragmento 58-61 de κ -caseína (H).



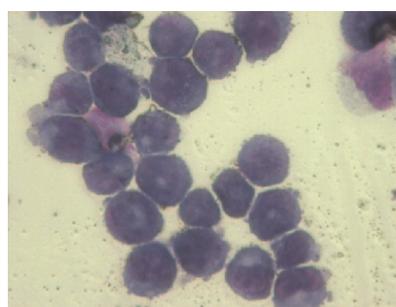
A) Células WEHI-3 control con vehículo



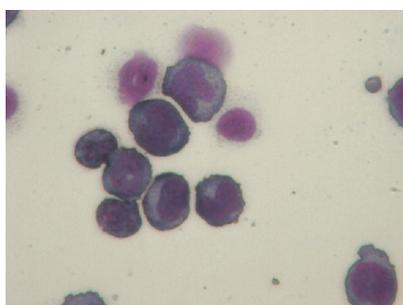
D) Fragmento 25-34 de κ -caseína



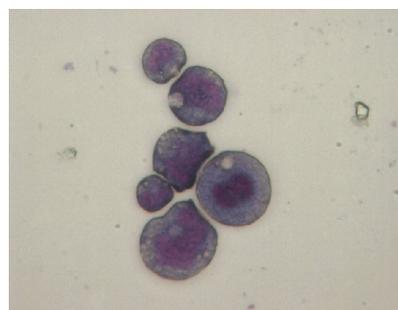
B) CasNa



E) Fragmento 35-41 de κ -caseína



C) Hidrolizado de caseína



F) Fragmento 58-61 de κ -caseína

Figura 14. **Morfología de las células WEHI-3 (400X)**, en presencia de CasNa, Hidrolizado de caseína y péptidos de κ -caseína. Las células fueron cultivadas por 72 horas y teñidas con **Giemsa**. Células WEHI-3 con sólo vehículo (A), con CasNa (B), con Hidrolizado de caseína (C), con fragmento 25-34 de κ -caseína (D), con fragmento 35-41 de κ -caseína (E) y con fragmento 58-61 de κ -caseína (F).

Evaluación citoquímica

Además de la determinación de la morfología mediante tinción Giemsa, y para tener una mayor certeza de hacia que linaje se diferencian las células tratadas con CasNa, Hidrolizado de caseína y los péptidos de κ -caseína, se realizaron tinciones citoquímicas específica: a) Tinción α -naftil acetato esterasa específica para el linaje monocito-macrófago y b) Tinción cloroacetato esterasa para el linaje granulocito-neutrófilo, además de esto, se utilizaron para las tinciones control, la línea celular monocítica P-388, la línea macrofágica J-774 y la línea celular fibroblástica L-929 o células de médula ósea de ratón. El criterio utilizado para la determinación de cada linaje fue “positivo” para las células que presentaran el color característico de la tinción o, “negativo” para las que no lo presentan.

Los resultados obtenidos de las tinciones indican que las células 32D tratadas con CasNa presentan mayor porcentaje de células positivas del linaje monocito-macrófago, aumentando significativamente a un 30% de células positivas, con la dosis empleada anteriormente (2 mg/mL); para el hidrolizado de caseína los datos muestran que el porcentaje aumenta a un 14.0% y el fragmento 25-34 a un 8.5% de células positivas, mientras que el control representa tan sólo el 3.3% de células positivas, diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto a éste (Tabla 4-A).

En cuanto a los fragmentos peptídicos 35-41 y 58-61 de κ -caseína no muestran diferencia significativa en los porcentajes de células positivas, 6.0% y 4.5% respectivamente, comparados con el control. En la tinción para granulocitos los datos muestran que el tratamiento con CasNa tiene un 14.2%, el de hidrolizado de caseína aumenta a un 18.0% y los péptidos fragmento 25-34 y 58-61 de κ -caseína muestran un 25.3% y 29.0% de células positivas hacia este linaje de manera significativa ($p < 0.05$), ya que los datos del cultivo control solo presenta un 7.7% de células positivas (Tabla 4-A) (Fig.15). El péptido fragmento 35-41 no tiene efecto significativo respecto al control.

La línea celular WEHI-3 en la tinción específica para monocitos-macrófagos, con el tratamiento de CasNa presentó un porcentaje de 14.7%, con hidrolizado de caseína presenta un 20.2% de células positiva, mostrando una diferencia significativa respecto al control, que tiene 7.0% de células positivas ($p < 0.05$), mientras que los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína muestran un 7.6%, 4.0%, 1.6% respectivamente y no tienen efecto significativo respecto al control ($p < 0.05$). Las células positivas para la tinción de granulocitos que presenta CasNa es de 35%, para hidrolizado de caseína de 24.6%, y para los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína 19.3%, 20%, 19% respectivamente, mostrando un efecto significativo en la diferenciación celular respecto al control ($p < 0.05$) (Tabla 4-B) (Fig.16).

A

Células 32D	Diferenciación Morfológica (%)		Tinción Citoquímica Específica (%)	
	Monocito-macrófago	Granulocito-neutrófilo	Monocito-macrófago	Granulocito-neutrófilo
Control	8 ± 0.1	0.0 ± 0.0	3.3 ± 2.0	7.7 ± 2.0
CasNa	37.0 ± 2.8*	3.0 ± 2.1*	30.5 ± 1.0*	14.2 ± 2.6*
Hidrolizado de caseína	20.0 ± 0.5*	8.0 ± 1.7*	14.0 ± 1.1*	18.0 ± 1.6*
Fragmento 25-34 de κ-caseína	12.2 ± 0.07*	5.8 ± 1.6*	8.5 ± 0.7*	25.3 ± 3.0*
Fragmento 35-41 de κ-caseína	8.3 ± 2.1	2.9 ± 3.1	6.0 ± 1.4	10.3 ± 1.1
Fragmento 58-61 de κ-caseína	8.0 ± 1.1	2.2 ± 1.8*	4.5 ± 0.7	29.0 ± 3.6*

Tabla 4-A. **Diferenciación Morfológica y Tinción Citoquímica.** Inducción a la diferenciación de las células 32D tratadas con CasNa, Hidrolizado de caseína, y péptidos de κ-caseína, evaluadas después de 72 horas de incubación. Porcentaje de monocito-macrófagos y granulocito-neutrófilos después de la tinción con Giemsa ó Citoquímica específica (alfa-naftil acetato esterasa para macrófagos y cloroacetato esterasa, para neutrófilos). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

B

Células WEHI-3	Diferenciación Morfológica (%)		Tinción Citoquímica Específica (%)	
	Monocito-macrófago	Granulocito-neutrófilo	Monocito-macrófago	Granulocito-neutrófilo
Control	6.0 ± 0.5	8.5 ± 1.1	7.0 ± 4.0	10.6 ± 1.1
CasNa	15.9 ± 2.5*	11.5 ± 1.0*	14.7 ± 3.6*	35.0 ± 5.0*
Hidrolizado de caseína	17.2 ± 1.8*	10.5 ± 0.5 *	20.2 ± 0.9*	24.6 ± 3.5*
Fragmento 25-34 de κ-caseína	7.8 ± 0.9*	9.5 ± 1.1	7.6 ± 1.5	19.3 ± 2.0*
Fragmento 35-41 de κ-caseína	7.8 ± 2.2	8.0 ± 0.5	4.0 ± 1.0	20.0 ± 1.0*
Fragmento 58-61 de κ-caseína	6.3 ± 1.5	9.0 ± 2.4	1.6 ± 0.5	19.0 ± 2.0*

Tabla 4-B. **Diferenciación Morfológica y Tinción Citoquímica.** Inducción a la diferenciación de las células WEHI-3 tratadas con CasNa, Hidrolizado de caseína, y péptidos de κ-caseína, evaluadas después de 72 horas de incubación. Porcentaje de monocito-macrófagos y granulocito-neutrófilos después de la tinción con Giemsa ó Citoquímica específica (alfa-naftil acetato esterasa para macrófagos y cloroacetato esterasa, para neutrófilos). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

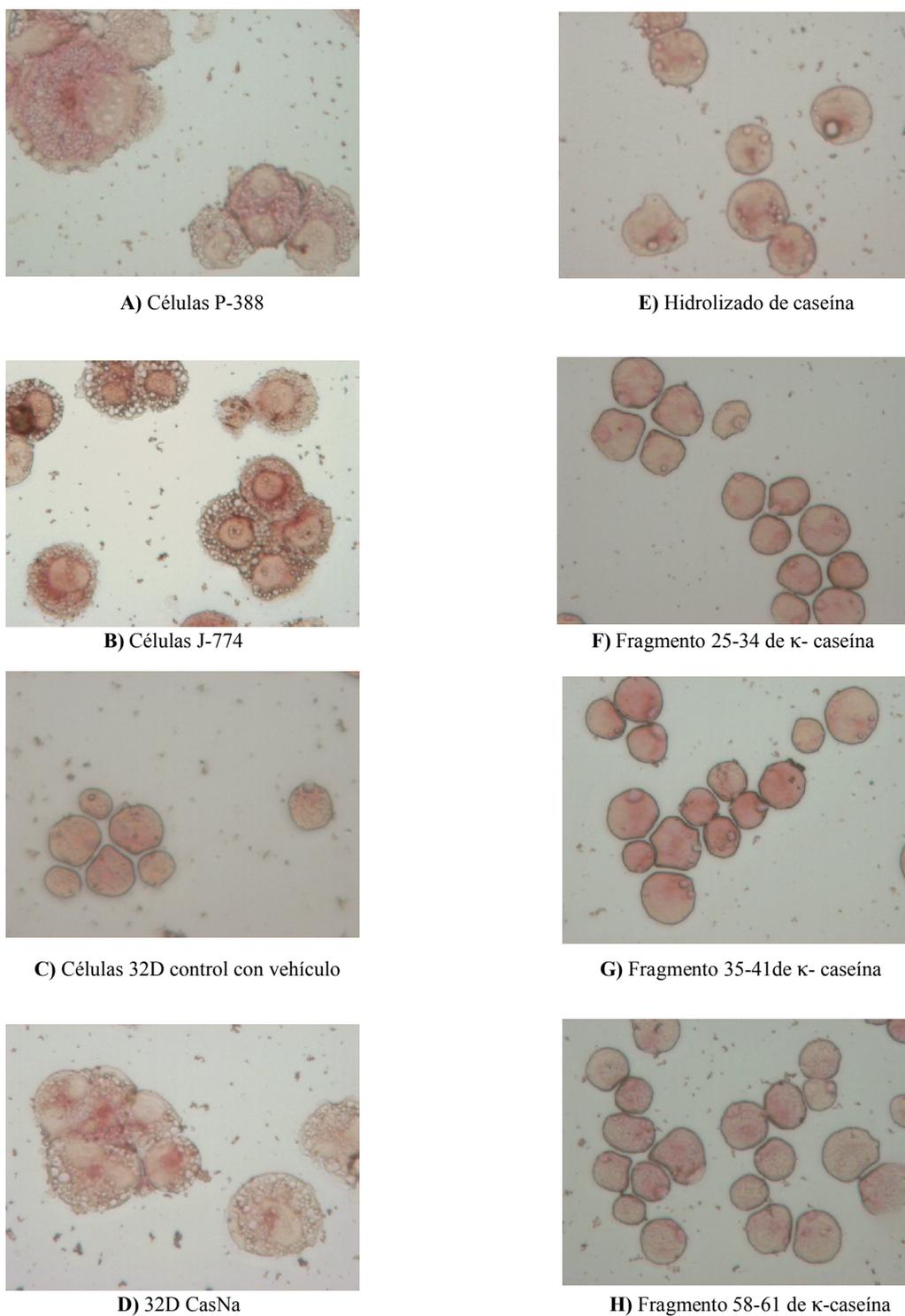
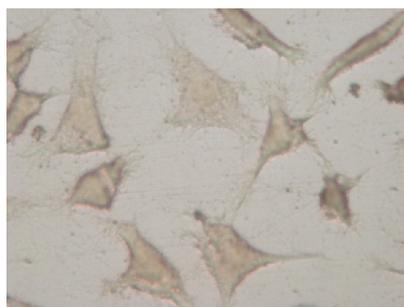
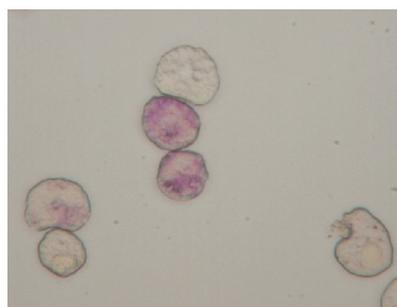


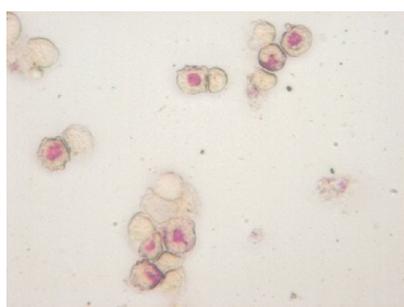
Figura 15. **Tinciones citoquímicas en células 32D (400X)**. Tinción α -naftil acetato esterasa específica para linaje monocito-macrófago. Línea monocítica P-388 (A), línea macrofágica J-774 (B), células 32D con sólo vehículo (C), como controles. Células 32D tratadas con CasNa (D), Hidrolizado de caseína (E), con fragmento 25-34 de κ -caseína (F), con fragmento 35-41 de κ -caseína (G) y con fragmento 58-61 de κ -caseína (H).



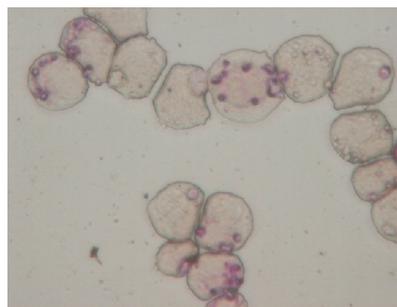
A) Células L-929



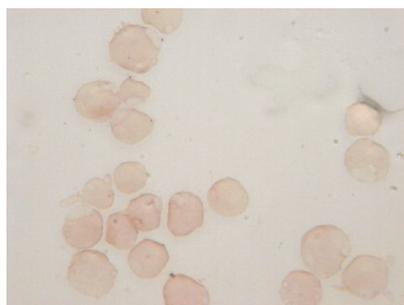
E) Hidrolizado de caseína



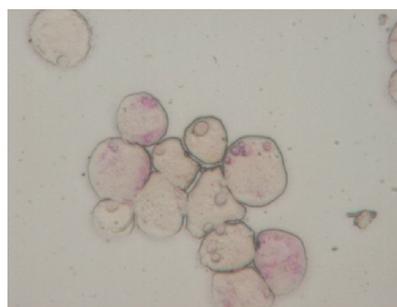
B) Células de médula ósea de ratón



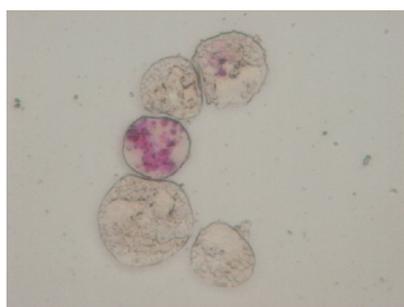
F) Fragmento 25-34 de κ -caseína



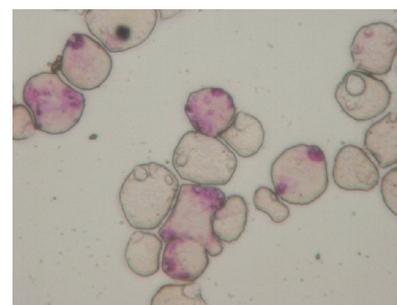
C) Células 32D control con vehículo



G) Fragmento 35-41 de κ -caseína

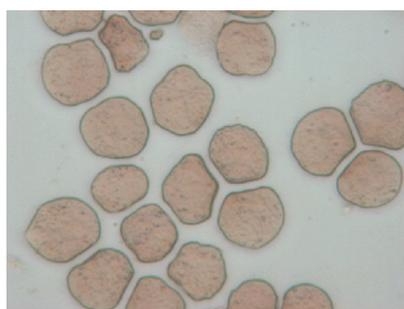


D) CasNa

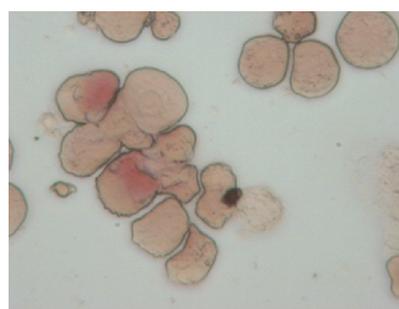


H) Fragmento 58-61 de κ -caseína

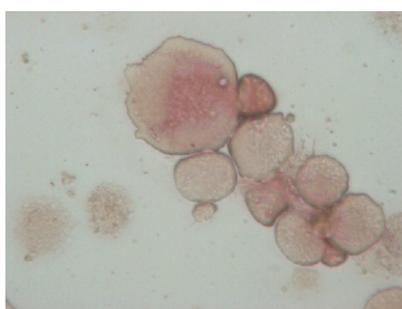
Figura 16. **Tinciones citoquímicas en células 32D (400X).** Tinción cloroacetato esterasa específica para linaje granulocito-neutrófilo. Línea monocítica L-929 (A), Células de Médula Ósea (B), células 32D con sólo vehículo (C), como controles. Células 32D tratadas con CasNa (D), Hidrolizado de caseína (E), con fragmento 25-34 de κ -caseína (F), con fragmento 35-41 de κ -caseína (G) y con fragmento 58-61 de κ -caseína (H).



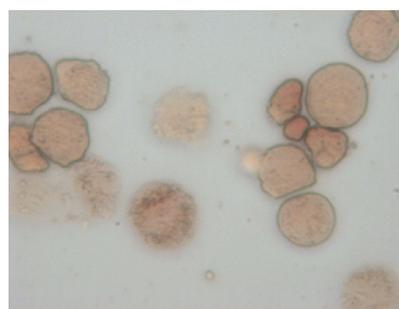
A) Células WEHI-3 control con vehículo



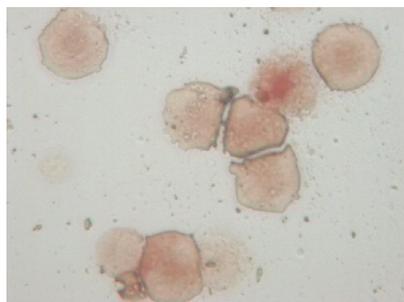
D) Fragmento 25-34 de κ -caseína



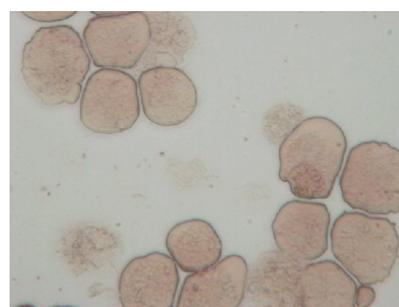
B) CasNa



E) Fragmento 35-41 de κ -caseína

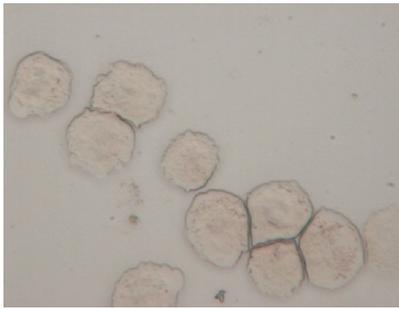


C) Hidrolizado de caseína

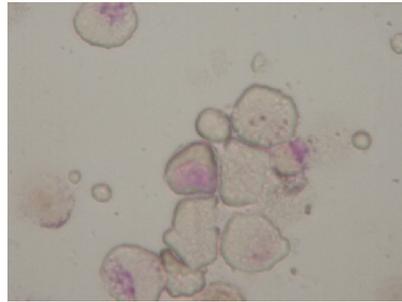


F) Fragmento 58-61 de κ -caseína

Figura 15. **Tinciones citoquímicas en células WEHI-3 (400X).** Tinción α -naftil acetato esterasa específica para linaje monocito-macrófago. Células WEHI-3 con sólo vehículo (A), con CasNa (B), con Hidrolizado de caseína (C), con fragmento 25-34 de κ -caseína (D), con fragmento 35-41 de κ -caseína (E) y con fragmento 58-61 de κ -caseína (F).



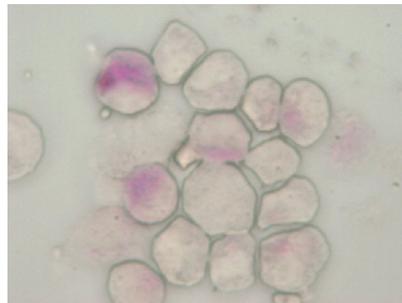
A) Células WEHI-3 control con vehículo



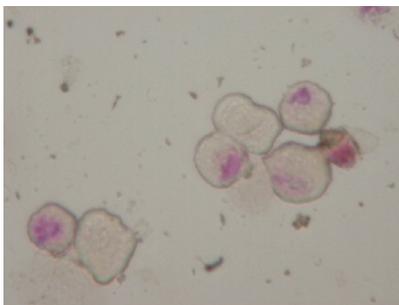
D) Fragmento 25-34 de κ -caseína



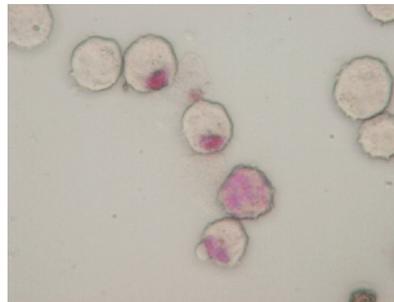
B) CasNa



E) Fragmento 35-41 de κ -caseína



C) Hidrolizado de caseína



F) Fragmento 58-61 de κ -caseína

Figura 16. **Tinciones citoquímicas en células WEHI-3 (400X).** Tinción cloroacetato esterasa específica para linaje granulocito-neutrófilo, (A) células WEHI-3 con sólo vehículo, (B) con CasNa, con Hidrolizado de caseína (C), con fragmento 25-34 de κ -caseína (D), con fragmento 35-41 de κ -caseína (E), con fragmento 58-61 de κ -caseína (F).

Evaluación por expresión de antígenos de superficie

Para tener una mayor precisión en la evaluación de la diferenciación, se determinó la aparición o el incremento de los antígenos de superficie del linaje monocito-macrófago y del linaje granulocito-neutrófilo mediante citometría de flujo, empleando el anticuerpo anti-Fms que reconoce un dominio extracelular del receptor del M-CSF (M-CSFR o c-fms), presente en células del linaje macrofágico (Riccioni *et al.*, 2003) y el anticuerpo Gr-1, el cual reconoce a un dominio de Ly-6G, que es una proteína de membrana de 21-25 kDa acoplada a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), ligado a diferenciación granulocítica (Zhang *et al.*, 2002).

Como primer paso los anticuerpos fueron empleados en la línea celular macrofágica de ratón P-388 para evaluar la especificidad del anticuerpo anti-Fms y células en banda de médula ósea de ratones CD-1 separadas por Ficoll y utilizadas para evaluar el anticuerpo Gr-1, (Fig.19-B,F), también se determinó la especificidad de los anticuerpos, empleándose un control de isotipo, se emplearon controles negativos, células en banda para el anticuerpo anti-Fms, y la línea fibroblástica L-929 para el anticuerpo Gr-1 (controles negativos) (Fig.19-A,E), también se evaluó la fluorescencia de las células sin anticuerpo (fluorescencia propia) (Fig.19-32D-C, G) y WEHI-3-D, H). En las células P-388 y en las células en banda, se observa un notable incremento en la fluorescencia de las células con los anticuerpos específicos y sus controles de isotipo, respecto a los controles negativos (Fig.19).

Para tener una mejor idea de las magnitudes del desplazamiento de la gráfica que indica incremento en la expresión del antígeno, se calculó un índice de Fluorescencia (IF), dividiendo la intensidad de fluorescencia de las células con el isotipo entre la fluorescencia de las células con su anticuerpo, por lo que un IF igual a 1 indica que los valores son iguales, un IF de dos indica que la fluorescencia de las células con el anticuerpo es el doble a las células con solo isotipo. La fluorescencia de las células P-388 con el isotipo es de 28.48 y de 145.82 en presencia del anticuerpo anti-Fms resultando un IF de 5.12 (Tabla 5-A). En las células en banda los valores de fluorescencia son de 4.14 con el isotipo y de 371.23 con el anticuerpo Gr-1 con un IF final de 89.67 (Tabla 5-B). Con estos ensayos se comprobó la especificidad de los anticuerpos.

Al determinar los niveles basales de ambos antígenos en las células 32D y WEHI-3, se obtuvo que en las células 32D la presencia de ambos antígenos es menor que en las células WEHI-3, lo cual corresponde al estadio de diferenciación reportado para ambas líneas celulares (Tabla 5-A y B).

Anti-Fms (Macrófagos)

Gr-1 (Granulocitos)

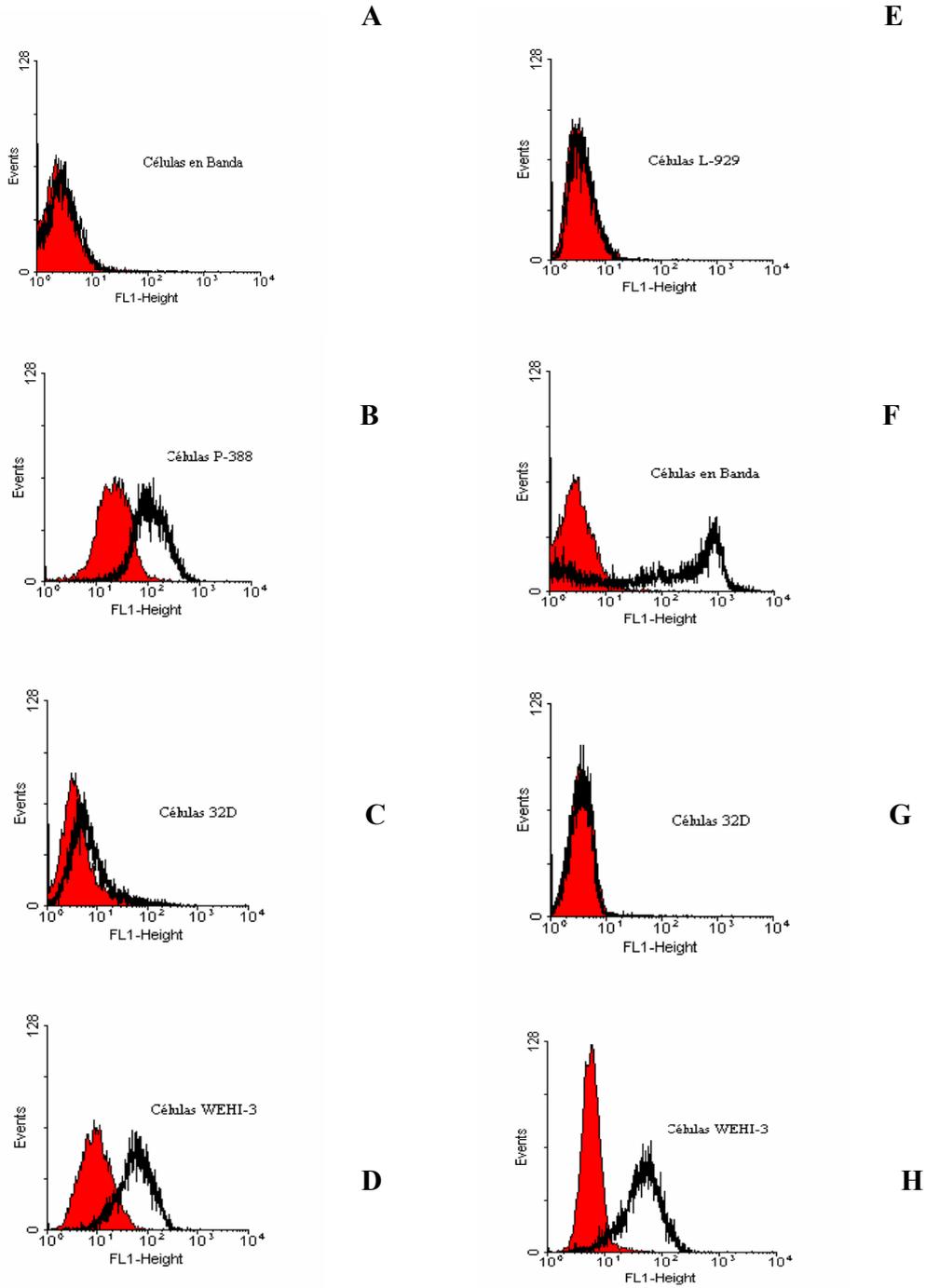


Figura 19. **Análisis de diferenciación por citometría de flujo (controles).** Para determinar la especificidad de los anticuerpos, se empleó en el anticuerpo anti-Fms, Células en banda de médula ósea de ratón como control negativo (A), y la línea celular monocítica P-388 como control positivo (B). Para el anticuerpo Gr-1 se empleó la línea celular fibroblástica L-929 como control negativo (E), y las células en banda de médula ósea como control positivo (F). Además se determinaron los niveles basales de las células 32D (C, G) y WEHI-3 (D, H). En todos los casos se evaluaron células en presencia del anticuerpo específico (Línea negra) y con el isotipo respectivo (línea roja). Los histogramas corresponden a una determinación representativa: Eje horizontal = intensidad de fluorescencia, eje vertical = número de eventos = 10000.

A	Isotipo	Anticuerpo (anti-Fms)	Índice de Fluorescencia (IF)
Células en banda de Médula Ósea (negativo)	47.83	109.33	2.28
Línea celular monocítica P-388 (positivo)	28.48	145.82	5.12
Línea celular 32D	25.48	42.68	1.67
Línea celular WEHI-3	30.71	93.88	3.05

B	Isotipo	Anticuerpo (Gr-1)	Índice de Fluorescencia (IF)
Línea celular fibroblástica L-929 (negativo)	4.13	4.31	1.04
Células en banda de Médula Ósea (positivo)	4.14	371.23	89.67
Línea celular 32D	11.87	10.87	0.916
Línea celular WEHI-3	7.25	39.21	5.41

Tabla 5. **Análisis de diferenciación por citometría de flujo (índices de fluorescencia)**. Células en presencia del anticuerpo anti-Fms (A) y (B) del anticuerpo Gr-1, y sus respectivos controles de isotipo.

Al realizar las evaluaciones de la expresión del c-fms en las células 32D en presencia de los diferentes derivados de caseína, los histogramas revelan un aumento en la intensidad de fluorescencia de los cultivos tratados con CasNa, hidrolizado de caseína y fragmentos peptídicos 25-34 y 35-41 de κ -caseína, al compararlos con los del cultivo de sólo vehículo, por otro lado el fragmento 58-61 de κ -caseína no muestra un desplazamiento evidente (Fig.20). Cuando se empleo el anticuerpo Gr-1 en las células 32D tratadas, los histogramas muestran aumento en el desplazamiento de la fluorescencia con el tratamiento de CasNa, hidrolizado de caseína, fragmentos peptídicos 25-34 y 58-61 κ -caseína, y en menor medida el péptido 35-41 de κ -caseína (Fig.21).

Expresión del antígeno c-fms en células 32D

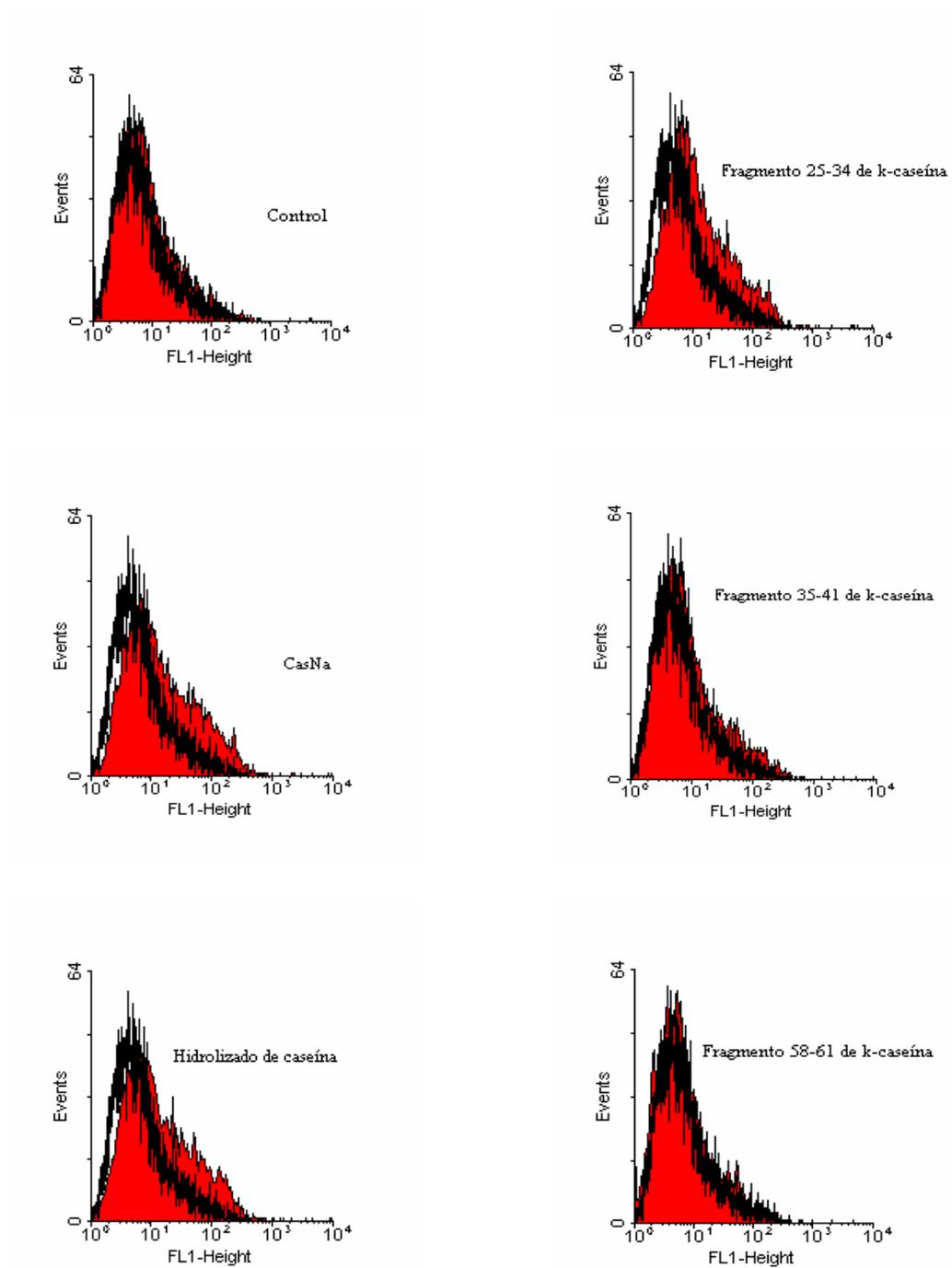


Figura 20. **Determinación de diferenciación por citometría de flujo en células 32D.** Las células 32D fueron cultivadas por 72 horas con PBS (línea en negro) ó con CasNa, Hidrolizado de caseína, fragmentos 25-34, fragmento κ -caseína, 35-41 de κ -caseína y fragmento 58-61 de κ -caseína (líneas en rojo). Se utilizó el anticuerpo anti-Fms para evaluar la diferenciación monocítica eje horizontal: intensidad de fluorescencia, eje vertical: número de eventos =10000.

Expresión del antígeno Gr-1 en células 32D

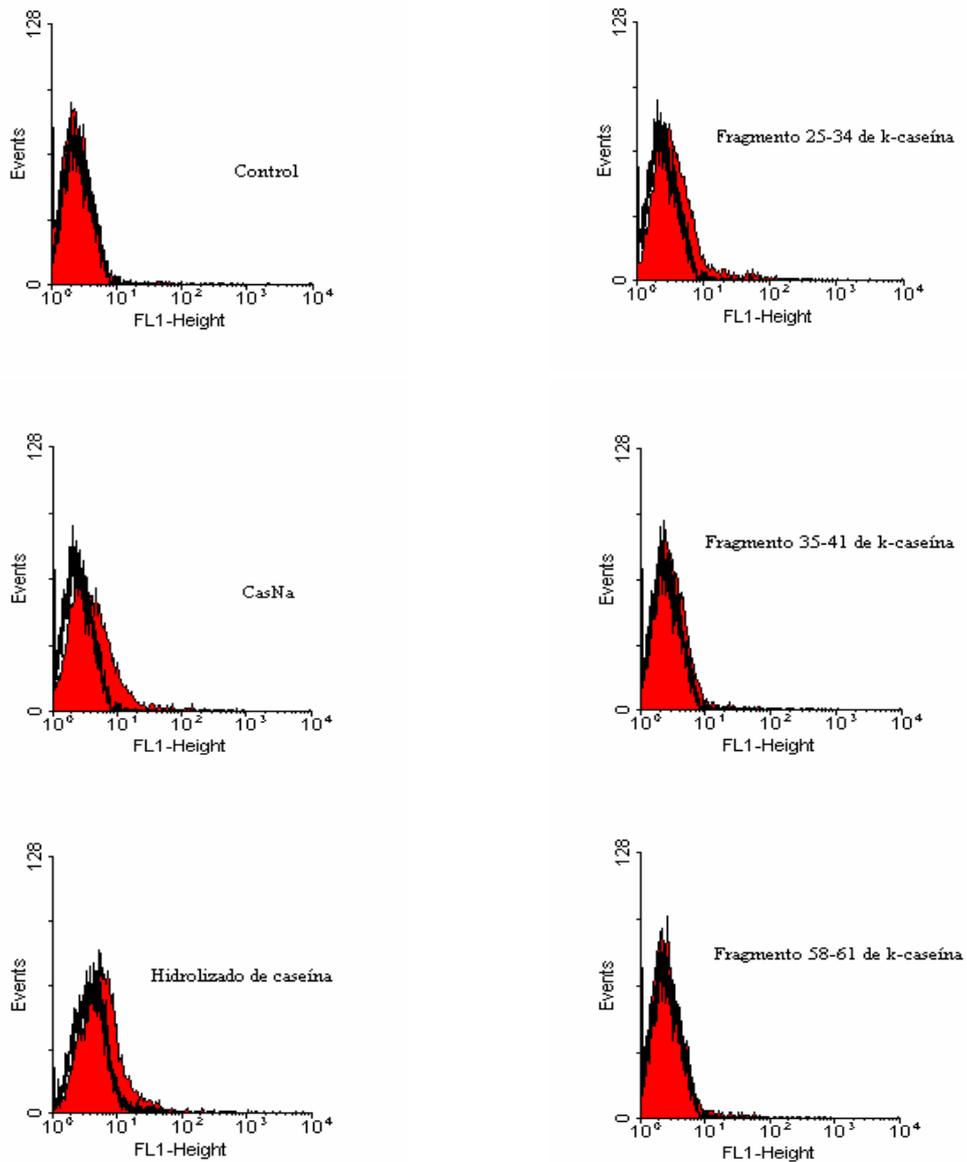


Figura 21. **Determinación de diferenciación por citometría de flujo en células 32D.** Las células 32D fueron cultivadas por 72 horas con PBS (línea en negro) ó con CasNa, Hidrolizado de caseína, fragmento 25-34 de κ -caseína, fragmento 35-41 de κ -caseína y fragmento 58-61 de κ -caseína (líneas en rojo). Se utilizó el anticuerpo Gr-1 para evaluar la diferenciación granulocítica. Eje horizontal: intensidad de fluorescencia, eje vertical: número de eventos = 10000.

Para tener una mejor idea de que tan real es el desplazamiento, se calculó un índice de fluorescencia dividiendo la intensidad de fluorescencia de las células tratadas entre la intensidad de la fluorescencia de las células cultivadas con solo vehículo (se presenta el promedio de 3 ensayos independientes). (Tabla 6)

Tratamiento	Anticuerpo (anti-Fms)	Anticuerpo (Gr-1)
Control	1.0	1.0
CasNa	2.3517	1.3969
Hidrolizado de caseína	2.1589	1.6894
Fragmento 25-34 de κ -caseína	1.8464	1.3514
Fragmento 35-41 de κ -caseína	1.3013	0.9024
Fragmento 58-61 de κ -caseína	0.8444	0.97

Tabla 6. **Índices de Fluorescencia** (fluorescencia tratamiento/ fluorescencia control) en células 32D en presencia de CasNa, Hidrolizado de caseína, fragmentos peptídicos 25-34, 35-41, y 58-61 de κ -caseína, evaluados con el anticuerpo para macrófagos (anti-Fms) y con el anticuerpo para granulocitos (Gr-1).

Para la línea celular WEHI-3 la determinación de los antígenos de superficie indicó que las células tratadas con CasNa, hidrolizado de caseína, y fragmentos peptídicos 25-34 35-41 y 58-61 de κ -caseína el desplazamiento en los histogramas no es evidente al emplear el anticuerpo anti-Fms (Fig.22). Para el anticuerpo Gr-1, los resultados muestran que los desplazamientos son mayores para todos los casos con respecto al control con solo vehículo (Fig.23), e incluso mayor que los obtenidos con el anticuerpo anti-Fms (Tabla 7).

Expresión del antígeno c-fms en células WEHI-3

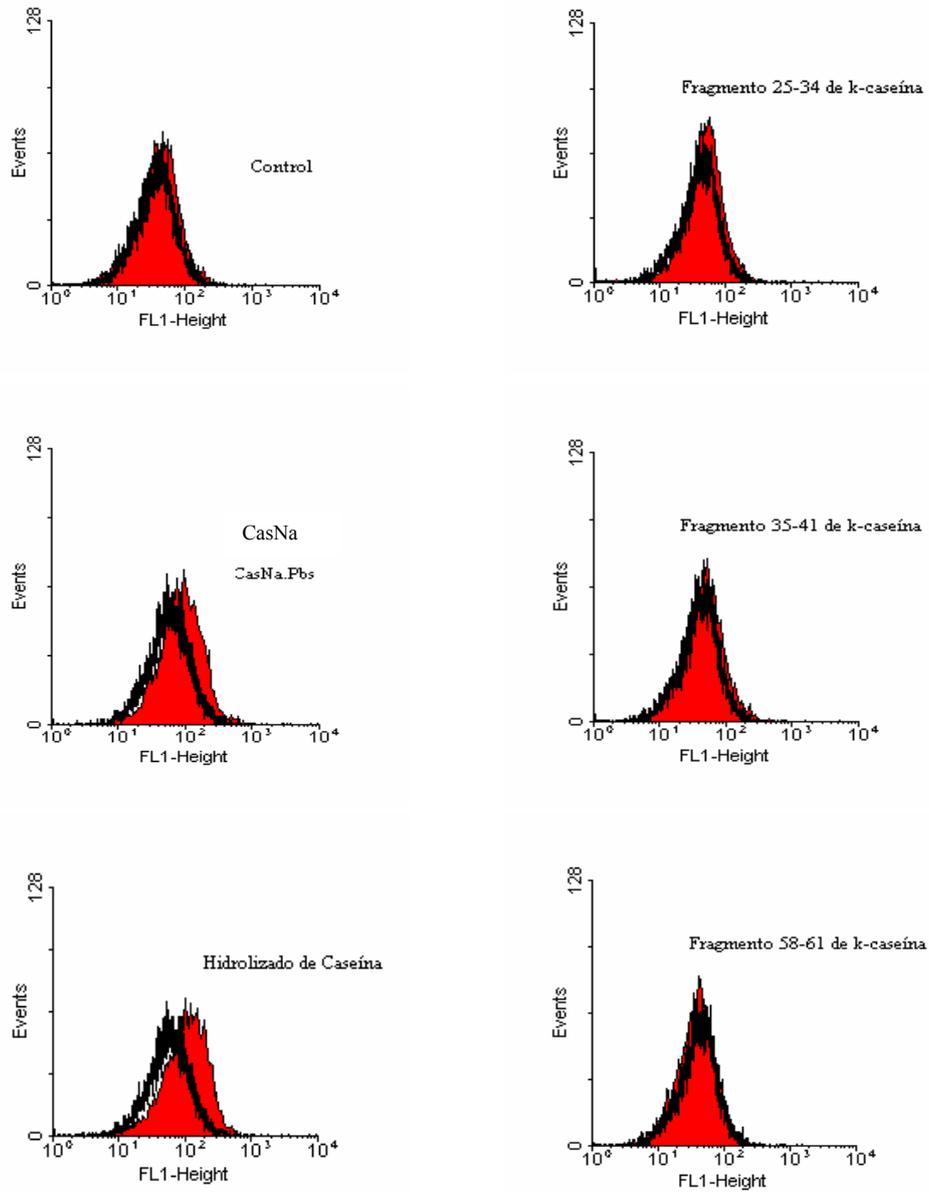


Figura 22. **Determinación de diferenciación por citometría de flujo en células WEHI-3.** Las células WEHI-3 fueron cultivadas por 72 horas con PBS (línea en negro) o con CasNa, Hidrolizado de caseína, fragmento 25-34 de κ -caseína, fragmento 35-41 de κ -caseína y fragmento 58-61 de κ -caseína (línea en rojo). Se utilizó el anticuerpo anti-Fms para evaluar la diferenciación monocítica eje horizontal: intensidad de fluorescencia, eje vertical: número de eventos =10000.

Expresión de antígeno Gr-1 en células WEHI-3

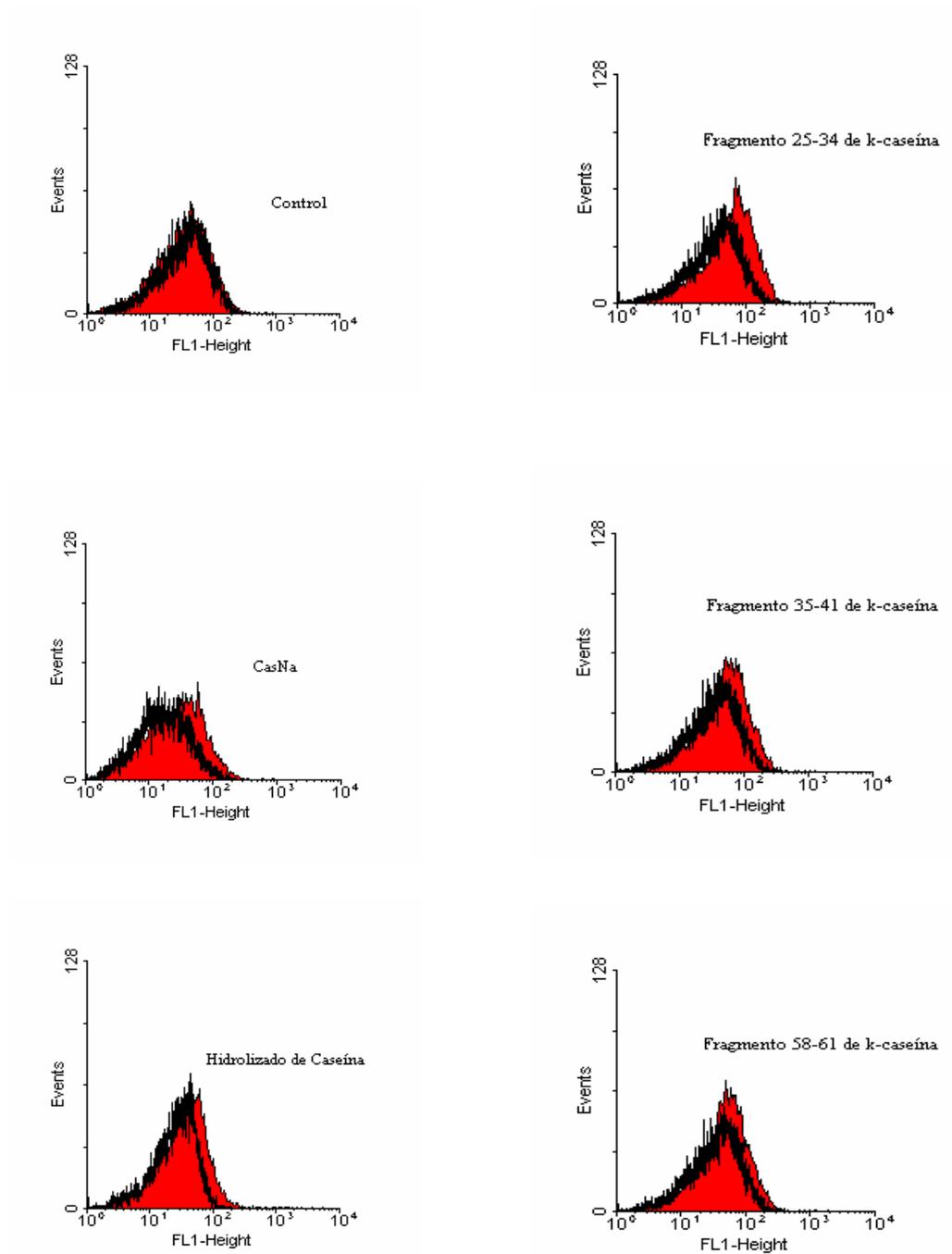


Figura 23. **Determinación de diferenciación por citometría de flujo en células WEHI-3.** Las células WEHI-3 fueron cultivadas por 72 horas con PBS (línea en negro) o con CasNa, Hidrolizado de caseína, fragmento 25-34 de κ -caseína y fragmento 35-41 de κ -caseína, fragmento 58-61 de κ -caseína (línea en rojo). Se utilizó el anticuerpo Gr-1 para evaluar la diferenciación granulocítica. Eje horizontal: intensidad de fluorescencia, eje vertical: número de eventos = 10000.

Tratamiento	Anticuerpo (anti-Fms)	Anticuerpo (Gr-1)
Control	1.0	1.0
CasNa	1.4353	1.4582
Hidrolizado de caseína	1.7159	1.3862
Fragmento 25-34 de κ -caseína	1.2965	1.6054
Fragmento 35-41 de κ -caseína	1.2630	1.3621
Fragmento 58-61 de κ -caseína	1.0414	1.2969

Tabla 7. **Índices de Fluorescencia** (fluorescencia tratamiento/ fluorescencia control) **en células WEHI-3** en presencia de CasNa, Hidrolizado de caseína, y fragmentos peptídicos 25-34, 35-41, 58-61 de κ -caseína; evaluados con el anticuerpo para macrófagos (anti-Fms) y con el anticuerpo granulocitos (Gr-1).

Los resultados anteriores indican que existe un aumento en la diferenciación de las células 32D cuando son cultivadas en presencia de CasNa, hidrolizado de caseína y el fragmento peptídico 25-34 de κ -caseína y la diferenciación es hacia ambos linajes, datos que apoyan a lo evaluado en tinciones citoquímicas. Mientras que en las células WEHI-3 cuando son cultivadas con CasNa, Hidrolizado de caseína la diferenciación es principalmente hacia el linaje monocito-macrófago y los péptidos de κ -caseína lo hacen hacia el linaje granulocito-neutrófilo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La leche y los productos lácteos son un alimento básico para la población en general, sin embargo, además de su reconocido papel nutritivo, en las últimas décadas la atención ha sido puesta en las actividades biológicas atribuidas a algunos de sus componentes. De particular interés son las caseínas (α , β y κ -caseína) y varios péptidos obtenidos de su proteólisis enzimática ya que tanto *in vitro* como *in vivo* pueden generar péptidos con actividades biológicas (Meisel, 1997). En los últimos años se ha demostrado que péptidos provenientes de la degradación enzimática de las caseínas tienen actividades biológicas como: inmunomoduladores, antihipertensivos, antitrombóticos, opioides (agonistas y antagonistas), antibacteriales, antitumorales, protectores gástricos, ligar y transportar minerales, especialmente calcio (Yamamoto, 1997; Meisel, 1999). La detección de algunos de estos péptidos en el sistema digestivo y en la circulación después de la ingestión de leche o productos lácteos (Chabance *et al.*, 1998), despierta gran interés en determinar sus efectos fisiológicos.

Recientemente se reportó que el hidrolizado enzimático de caseína inyectado en ubre de vaca tiene la capacidad de inducir la acumulación de granulocitos en el sitio de inyección (Shamay *et al.*, 2003). Otros investigadores han encontrado que existen otros péptidos producto de la degradación de la caseína con actividad antitumoral, similar a la caseína completa (Gill, 2000). Con relación a cada caseína se ha reportado que el hidrolizado de α -caseína estimula la proliferación de células T (Pessi *et al.*, 2001) y el hidrolizado de la β -caseína incrementa *in vivo* los títulos de anticuerpos (Heddleson *et al.*, 1997), incluso péptidos como la 1-7 β -casomorfina proveniente la β -caseína incrementa o suprime la capacidad proliferativa de linfocitos (Kayser y Meisel, 1996), también la 90-95 α -casomorfina proveniente de la α -caseína y la 1-5 β -casomorfina y la 1-7 β -casomorfina reducen fuertemente la proliferación *in vitro* de líneas celulares de cáncer de seno y próstata (Kampa *et al.*, 1996; Hatzoglou *et al.*, 1996).

Lo anteriormente descrito pone en evidencia la ausencia de información sobre el efecto del hidrolizado de caseína y algunos péptidos sobre la proliferación y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas normales y leucémicas.

En este trabajo mostramos que el CasNa, el HC y el fragmento peptídico 25-34 de κ -caseína, tienen la propiedad de bloquear la proliferación de la línea hematopoyética multipotencial de ratón 32D, y de la línea leucémica mielomonocítica WEHI-3, también inducen la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo. El fragmento peptídico 35-41 de κ -caseína reduce la proliferación en ambas líneas celulares e induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago en células 32D, y en células WEHI-3 lo hace hacia el linaje granulocito-neutrófilo, mientras que el fragmento peptídico 58-61 no tiene efecto en la proliferación de ninguna de las líneas pero induce diferenciación hacia granulocitos en ambas líneas celulares. Esta reducción de la proliferación no se debe a un posible efecto citotóxico de las moléculas.

Trabajos 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 o que se ha diferenciado completamente (Zucker *et al.*, 1988; Brietman *et al.*, 1994). Anteriormente se obtuvieron resultados de que el CasNa induce diferenciación de las células 32D generando monocitos en 4 días a cierta dosis, considerándolo como un factor con propiedades inductoras hacia la diferenciación (Ramos *et al.*, 2000). Es conocido que a mayor grado de diferenciación, menor potencial de proliferación (Lee R. *et al.*, 1998), por lo que sería interesante extender el tiempo de cultivo de las células WEHI-3 en presencia de caseínas para evaluar si estas moléculas pueden inhibir completamente la proliferación.

Sería extraordinario mostrar que el CasNa ó el HC finalmente puedan inhibir completamente la proliferación de líneas celulares, incluyendo a las leucémicas, ya que nuestro grupo tiene evidencias de que las células normales de médula ósea de ratón proliferan en presencia de CasNa, tanto *in vitro* como *in vivo*. De confirmarse nuestras observaciones estaríamos ante la posibilidad de tratar individuos leucémicos con CasNa el cual en principio podría activar la hematopoyesis normal y bloquear a la leucémica, una estrategia terapéutica ansiada por los médicos oncólogos.

El CasNa tiene moléculas completas de alfa, beta y kappa-caseína, mientras que el HC contiene péptidos derivados de la degradación proteolítica de las caseínas (Walstra, 1984), llama la atención que ambas tengan efectos biológicos similares sobre las células 32D y WEHI-3. Aunque en la mayoría de los estudios se encuentra que el CasNa ejerce una mayor actividad.

Sería interesante analizar si el CasNa actúa sobre la célula en forma íntegra o sufre proteólisis y los productos derivados sean los que ejerzan la diferencia en este efecto, por tanto merece que se analice cual es la parte del CasNa responsable de tal modulación.

Otra posibilidad es que en el hidrolizado existan péptidos con actividad supresora y activadora de la proliferación y diferenciación celular, como ocurre con algunos péptidos de caseína que tienen actividad agonista o antagonista opioide en células sanguíneas maduras (Meisel, 1997), por lo que sería necesario separar sus componentes y analizar sus efectos en forma individualizada.

Un dato reportado recientemente indica que la κ -caseína muestra un mayor potencial para inhibir la proliferación de WEHI-3 al comparar su efecto con otras caseínas (Ramos *et al.*, 2004). Anteriormente se reportó que los fragmentos peptídicos 25-34 (Casoxina C), 35-41 (Casoxina A) y 58-61 (Casoxina B) obtenidos de κ -caseína tienen actividad opioide antagonista (Meisel, 1997, 1999; Takahashi *et al.*, 1997; Chiba *et al.*, 1989). En este trabajo mostramos que los péptidos derivados de κ -caseína llamados casoxinas modulan la hematopoyesis en forma diferencial incluso el fragmento peptídico 58-61 no frena la proliferación, pero si induce diferenciación en ambas líneas. Estos datos se suman a los efectos biológicos reportados en la hematopoyesis por otros péptidos reportados con propiedades opioides agonistas, las casomorfina como 90-95 α -casomorfina no altera la proliferación de las células 32D ni de WEHI-3, la 1-5 β -casomorfina reduce la proliferación de las células 32D, pero no de WEHI-3, mientras que 1-7 β -casomorfina disminuye ligeramente la proliferación de ambas líneas celulares, pero ninguna de las tres casomorfina inducen la diferenciación (Ramos, 2004) Estos datos sugieren que dentro de una misma caseína, se obtienen péptidos con diferentes actividades en la hematopoyesis, y esto explica el efecto biológico del HC en la hematopoyesis.

Sería importante identificar y aislar los péptidos con mayor actividad inhibidora de la proliferación o inductora de diferenciación celular, particularmente aquellos que solo puedan afectar a las células anormales, actividad selectiva que parece tener el CasNa.

Los resultados obtenidos aportan nuevas evidencias donde se indica que la actividad de estos compuestos abarca a las células hematopoyéticas progenitoras, y colocan al CasNa, hidrolizado de caseína, y los fragmentos peptídicos 25-34, 35-41 y 58-61 de κ -caseína como reguladores de procesos fundamentales en la hematopoyesis, como lo es la diferenciación de progenitores mieloides. Sería fundamental conocer el mecanismo de activación causado por cada molécula y así entender la relevancia biológica en la hematopoyesis y otros eventos fisiológicos importantes en la respuesta inmune.

CONCLUSIONES

- El Hidrolizado de caseína, CasNa y el fragmento peptídico 25-34 de κ -caseína bloquean la proliferación de la línea hematopoyética multipotencial de ratón 32D y de la línea leucémica mielomonocítica WEHI-3, sin alterar la viabilidad celular, además de inducir una diferenciación celular hacia los linajes monocito-macrófago y linaje granulocito-neutrófilo.
- El fragmento peptídico 35-41 de κ -caseína reduce la proliferación en ambas líneas celulares, e induce diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago en células 32D, y en células WEHI-3 la diferenciación es hacia el linaje granulocito-neutrófilo.
- El fragmento peptídico 58-61 de κ -caseína no reduce la proliferación celular, sin embargo, induce diferenciación hacia el linaje granulocito-neutrófilo, en ambas líneas celulares.

BIBLIOGRAFÍA

- ✿ Aguirre de Ávalos M. V, Quintana R, Brandon N. (2002). Citoquinas. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina U.N.N.E.
- ✿ Ahmed N and Berridge M. V. (1999). Distinct regulation of glucose transport by interleukin-3 and oncogenes in a murine bone marrow-derived cell line. *Biochem Pharm.* 57: 387-396.
- ✿ Akashi K, Reya T, Dalma-Weishausz D, Weissman I. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all lineages. *Nature* 404: 193-197.
- ✿ Aranishi F, Hara K, Osatomi K, Ishihara T. (1997). Cathepsins B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comp Biochem Physiol.* 117: 605-611.
- ✿ Aschkenasy A. (1971). Effets comparés de la caséine et de divers melanges aminoacides sur la restauration de lerythropoiése, de la neutropoiése et de la lymphopoiése chez des rats prepares par une privation prolongée de protéines. *Nouvelles études. Arch. Sci Physiol.* 25: 415-430.
- ✿ Barreda D, Hanington P, Belosevic M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Inmunol.* 28: 509-554.
- ✿ Bautista M. (1998). Efecto de los factores activadores y diferenciadores sobre el granulocito-neutrófilo en banda: diferenciación, fragmentación del ADN y producción de M-CSF. Tesis Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM.
- ✿ Belitz G, Belitz D. (1999). *Food chemistry, second edition.* Serinquer. Alemania. 470-482.
- ✿ Brietman T, Chen Z, and Takahashi N. (1994). Potential applications of cytodifferentiation therapy in hematologic malignancies. *Sem Hematol.* 31: 18-25.
- ✿ Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jolles P, Fiat AM. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie.* 80: 155-165.
- ✿ Chiba H, Tani F, Yishikawa M. (1989). Opioid antagonist peptides derived from κ -casein. *J Dairy Res.* 56: 363-366.
- ✿ Dexter T (1989). Haemopoietic growth factor. *Brit Med Bulletin* 45: 337-349.

- ☀ Díaz M, Dunn M., McClements D, and Dec E. A. (2003). Use de caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in water emulsions. *J Agric Food Chem.* 51: 2365-2370.
- ☀ Eigel WN, Butler J E, Erstrom H M, Farell V R, Harwalker, Jenness R M, Whitney R, (1984). Nomenclature of proteins of cows milks. *J Dairy Sc.* 67: 1539-1545.
- ☀ Fox P. F, and Flynn A. (1992). Biological properties of milk protein. *Advanced Dairy Chemistry. Proteins* Fox PF. London Elsevier Applied Science. 255-284.
- ☀ Freshney R. I. (1994). *Culture of animal cells a manual of basic technique.* 3^{ra} edition, Wiley-Liss. NY. USA. 486 pp.
- ☀ Gill H S, Doull F, Rutherford K. J, Croos M L. (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Brit J Nut,* 84 suppl 1: S111-S117.
- ☀ Greenberger J, Sakakeeny M, Humphries R, Eaves C, Eckner R. (1983). Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80: 2931-2935.
- ☀ Hallek M. (1995). Tyrosine kinases and phosphatases in hematopoietic growth factor signaling. In Mertelsmann R and Herrman F. *Hematopoietic growth in clinical applications.* Second Edition. Marcel Deker New York. 19 pp.
- ☀ Hata I, Higashiyama S, Otani H. (1998). Identification of a phosphopeptide in bovine α_{s1} -casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures. *J Dairy Res.* 65: 569-578.
- ☀ Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martin PM, Castanas E. (1996). Antiproliferative and receptor binding properties of α - and β -casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol.* 310: 217-223.
- ☀ Heddleson R, Park O, Allen J. (1997). Immunogenicity of casein phosphopeptides derived from tryptic hydrolysis of β -casein. *J Dairy Sci.* 80: 1971-1976.
- ☀ Hughes-Jones NC. and Wickramasinghe E. (1991). *Lecture notes on haematology.* Blackwell Scientific Publications, London 225 pp.
- ☀ Jolles P, Levy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillensen D, Thomaidis A, *et al.* (1986). Analogy between fibrinogen effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *Eur J Biochem.* 158: 379-382.
- ☀ Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, and Castanas E. (1996). Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α -s₁-casein (α -s₁-casomorphin, and α -s₁-casomorphin amide). *Biochem J.* 319: 903-908.

- ☀ Kayser H, and Meisel H. (1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 382: 18-20.
- ☀ Kilara A, and Panyam D. (2003). Peptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Sci and Nut*, 43: 607-633.
- ☀ Kreider B, Phillips P, Prystowsky M, Shireat N, Pierce J, Tushinski R. (1990). 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.* 10: 4846-4853.
- ☀ Lagunes S H E. (2004). Estimulación de la hematopoyesis medular y extramedular inducida por el caseinato de sodio (CasNa) en ratones BALB-c. Tesis Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM.
- ☀ Lahov y Regelson, (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.* 34: 131-145.
- ☀ Ledesma E. (2005). El Caseinato de sodio (CasNa) induce la producción de TNF- α en la línea celular 32D de ratón. Tesis de maestría. FES-Zaragoza UNAM.
- ☀ Lee R, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer J, Rodgers G. Wintrobe's. (1999). *Clinical hematology*. Lippincott Williams & Wilkins. USA. Tenth edition. Vol. 1. 1482 pp.
- ☀ Li C, Lam K, Yam L, (1973). Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem*; 21:1-12.
- ☀ Lonnerdal Bo (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nut*; suppl 77: 1537S-1543S.
- ☀ Lotem J, and 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.
- ☀ Mc Donal G A, J Paul, Cruickshank (1995). *Atlas of hematology*. 5^a edition. Panamericana. 227 pp.
- ☀ Mc Intosh G H, Regester G O, Leu L R K, Rogle P J, Smither G W. (1995). Dairy protein protect against dimethylhydrazine induced intestinal cancer in rats. *J Nutr.* 125: 809-816.
- ☀ Meisel H. (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolimers.* 43:119-128.
- ☀ Meisel H, and Bockelmann W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional propertiese. *Antonie van Leewenhock.* 76: 207-215.

- ✿ Meisel H, and Gerald Fitz, R.J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulation effects. *Curr Phar Desing*, 9: 1289-1295.
- ✿ Melo B. (2004). La α , β y κ -caseína induce diferencialmente la expresión de mRNA para M-CSF, GM-CSF y sus receptores en las células 32D y WEHI-3. Tesis de Licenciatura, FES-Zaragoza UNAM.
- ✿ Metcalf D. (1998). Cell-Cell signaling in the regulation of blood cell formation and function. *Inmunol Cell Biol* 76: 441-447.
- ✿ Metcalf D, Robb L, Dunn A, Mifsud S, 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.
- ✿ Monetini L, Barone F, Stefanini L, Petrone A, Walk T, Jung G, Thorpe R, Pozzilli P and Cavallo M G. (2003). Establishment of T cell lines to bovine beta-casein and beta casein derived epitopes in patients with type 1 diabetes. *J Endocrinol* 176: 143-150.
- ✿ Morrison S, Uchida N and Weissman I (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11: 37-71.
- ✿ Munker R. Hiller E. Paquette R. (1998). *Modern hematology. Biology and clinical management*. Human Press, New Jersey. 369 pp.
- ✿ Munker R. (2000). *Modern hematology*. 1ra ed. Hunan Press USA.
- ✿ Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, and Takano T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I converting enzyme. *J. Dairy Sci*. 78: 1253-1257.
- ✿ Ogawa M, Matsunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Ann NY. Acad Sci*. 872: 17-23.
- ✿ Ogawa M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietics cells. *Blood* 81: 2844-2853.
- ✿ Okano M, Ohnota M, and Sasaki R. (1992). Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J Nut*. 122: 1376-1383.
- ✿ Orkin SH. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem*. 270: 4955-4958.
- ✿ Orlic D and Bodine DM. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up?. *Blood*. 84: 3991-3994.

- ✱ Passegué E, Catriona H. M. Jamieson, Laurie E. Ailles, Irving L. Weissman. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci. suppl-1*: 11842-11849.
- ✱ Passotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G. (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol. 2*: 71-81.
- ✱ Pessi T, Isolauri E, Sutas Y, Kankaanranta H, Moilanen E, Hurme M. (2001) Suppression of T-cell activation by Lactobacillus rhamnosus GG-degraded bovine casein. *Int Immunopharmacol. 1*: 211-218.
- ✱ Prosper F. and Catherine M. Verfaillie. (2001). Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leuk Biol. 69*: 307-313.
- ✱ Quesenberry P, Levitt I. (1979). Hematopoietic stem cells. *N Engl Med. 301*: 755-761.
- ✱ Ralph P, Moore M and Nilsson Kenneth (1976). Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp. Med. 143*: 1528-1533.
- ✱ Ralph P, Broxmeyer H. and Nakoinz I. (1977). Immunostimulator induce granulocyte/macrophage colony-stimulating activity and Block proliferation in a Monocyte tumor cell line. *J Exp. Med. 146*: 611-616.
- ✱ Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. (2000). El caseinato de sodio (CasNa) induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Invest Clin. 52*: 638-644.
- ✱ Ramos G, Weiss B, Cordova Y, Hernández J, Zambrano I, and Santiago E. (2004a). Sodium caseinate induces expression and secretion of murine multipotent myeloid cell line 32D macrophage colony-stimulating factor. *Arch Med Res. 35*: 109-13.
- ✱ Ramos G. (2004b). Efecto de caseínas y casomorfinas en la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mieloides 32D y WEHI-3. Tesis de doctorado. FES-Zaragoza, UNAM.
- ✱ Ramos G, Lagunes H, Ledesma E, Galván A, Weiss B, Santiago E. (2001). Efecto del CasNa en la proliferación y viabilidad de células leucémicas y células mononucleadas de médula ósea. *Rev Biomédica. 12*: supl. 1: S33-34.
- ✱ Riccioni R, Saulle E, Militi S, Sposi NM, Gualtierio M, Mauro N, Manzini M, Di verio D, Lo Coco F, Peschle C and Testa U. (2003). C-fms expresión correlates with monocytic differentiation in PML-RAR α^+ acute promyelocytic leukemia. *Leukemia. 17*: 98-113.
- ✱ Robinson David S. (1991). Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acriba S.A. Zaragoza España.

- ☀ Sachs L. (1996). The control of hematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4742-4749.
- ☀ Sandré C, Gleizes A, Forestier F, Gorges-Kergot R, Chilmonczyk S, Léonil J, Moreau MC and 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 Nut.* 131: 2936:2942.
- ☀ Santiago E, Mora L, Montesinos J, Ventura J, Macuca C, Mendoza J. (1994). Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblasts. *Rev Invest Clin; Supl-1*: 253.
- ☀ Shamay A, Shapiro F, Leitner G, and Silanikove N. (2003). Infusions of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupt tight junction integrity and induce involution in cows. *J Dairy Sci.* 86: 1250-1258.
- ☀ Socolovsky M, Constantinescu S, Bergelson S, Sirotkin A, Lodish H. (1998). Cytokines in hematopoiesis; Specificity and redundancy in receptor function, *Adv Protein Chem.* 52: 141-198.
- ☀ Strelkov Leonid A., Mikhailova Augusta A., Fonina Larissa A., Petrov Rem V. (2000). A new endogenous differentiating factor (myelopeptide-4) for myeloid cells. *FEBS Letters* 470: 281-284.
- ☀ Svedberg J, De Hams J, Leimenstoll, Teschemacher H. (1985) Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in vitro digests of bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides Fayetteville.* 6: 825-830.
- ☀ Takahashi M, Moriguchi S, Suganuma H, Shiota A, Tani F, Usui Hachiro, Kurahashi S and Yoshikawa M. (1997). Identification of Casoxin C, An Ileum-contracting peptide derived from bovine κ -casein, as an agonist for C3a receptors. *Peptides.* 18: 329-336.
- ☀ Tatsura M, Lishi H, Baba M and Taniguchi H. (1992) Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in wistar rats fed a low-protein diet. *Int J Cancer.* 50: 108-111.
- ☀ Teschemacher H, Koch G, Brantl V. (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopoly.* 43: 99-117.
- ☀ Tirelli A, De Noni I and Resmini P. (1997). Bioactive peptides derived in milk products. *J Food Sci.* 2: 91-98.
- ☀ Toles J, Chui D, Belbeck L, Starr E and Barker J. (1989). Hemopoietic stem cells in murine embryonic yolk sac and peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 7456-7459.
- ☀ Tomita M, Takase M, Bellamy W, and Shimamura S. (1994). The peptides of lactoferrin. *Act. Paed Jap* 36: 585-591.

- ✿ Valtieri M, Tweardy D, Caracciolo D, Johnson K, Maulio A S. (1987). Cytokine – dependent granulocyte differentiation. Regulation of proliferative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol.* 138: 3829-3835.
- ✿ Vegarud Gerd E., Langsrud T., and Svenning C. (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *Brit J Nut.* 84 suppl-1: S91-S98.
- ✿ Vituri C I, Alvarez-Silva M, Trentin A and Borelli P, (2000). Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. *J of Med and Biolog Research.* 33: 889-895.
- ✿ Walstra P, and Jenners R. (1984). *Dairy chemistry and physics.* John Wiley Sons, NY. 106 pp.
- ✿ Wong C, Seow H, Liu A, Hunsbad A, Smithers G, *et al.* (1996). Modulation of immune response by bovine β -casein. *Immunol Cell Biol.* 74: 323-329.
- ✿ Yamamoto N. (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers.* 43: 129-134.
- ✿ Yorder Mervin C. (2001). Introduction: spatial origin of murine hematopoietic stem cells. *Blood.* 98: 3-5.
- ✿ Zambrano-Ramírez I R, Santiago O E, Weiss S B, Cáceres C R. (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev Inv Clin.* 51: 53-66.
- ✿ Zhang P, Nelson E, Radomska H, Iwasaki-Arai J, Akashi K, Friedman A, and Tenen D. (2002). Induction of granulocytic differentiation by 2 pathways. *Blood.* 99: 4406-4412.
- ✿ Zucker-Franklin, Greaves F M, Grossi C E, Marmont A M. (1998). *Atlas of blood cells function and pathology.* Second edition Vol II and I. Edi-Ermes and Gustav Fischer. 777 pp.
- ✿ Zucht H, Raida M, Adermann K, Marget H, Forssmann W. (1995). Casocidin- α -casein α -s₂- derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters.* 372: 185-188.

APÉNDICE A

I. Inactivación de suero fetal bovino (SFB).

El suero fetal bovino SFB (Gibco BRL, USA) congelado se coloca a temperatura ambiente para su descongelación, posteriormente se pasa a un baño de agua a 56°C durante 30 minutos, con el propósito de inactivar proteínas del complemento. Posteriormente se separan en alícuotas, para su mejor manipulación. Conservar en refrigeración a 4°C.

II. Preparación Medio Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM).

- ◆ Preparación en 1 litro de Agua-miliQ.
- ◆ Iscove's 17.7 g (un sobre aproximadamente).
- ◆ Penicilina 0.031 g
- ◆ NaHCO₃ 3.024 g
- ◆ pH 6.9-7.0

Esta solución se esteriliza por medio de una membrana (Millipore) con un diámetro de 0.22 µm. Conservar en refrigeración a 4°C.

III. Solución estabilizadora de Fosfatos (PBS).

Esta solución fue utilizada como vehículo del CasNa, las sales de fosfatos proporcionan la capacidad estabilizadora a esta solución, y se compone de:

- | | |
|--|--------|
| ◆ Cloruro de magnesio (MgCl ₂)(Sigma, Chem, USA) | 0.10 g |
| ◆ Cloruro de calcio (CaCl ₂)(Sigma, Chem, USA) | 0.10 g |
| ◆ Cloruro de sodio (NaCl)(Sigma, Chem, USA) | 8.00 g |
| ◆ Cloruro de potasio (KCl)(Sigma, Chem, USA) | 0.20 g |
| ◆ Fosfato monoácido de sodio (Na ₂ HPO ₄)(Sigma, Chem, USA) | 2.16 g |
| ◆ Fosfato diácido de potasio (KH ₂ PO ₄)(Sigma, Chem, USA) | 0.20 g |

El cloruro de magnesio y cloruro de calcio se disuelven en 100 mL de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se disuelven en 800 mL de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el pH de 7.2 a 7.5 utilizando ácido clorhídrico 8N (Sigma, Chem, USA), y se afora a un volumen final de 1000 mL. Esta solución se esteriliza por medio de una membrana (Millipore) con un diámetro de 0.22 µm, la solución se almacena a una temperatura de 4°C.

IV. Interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3).

Preparar 10 mg de albúmina en 10 mL de PBS (0.1%) Agitar hasta disolver. Filtrar con un filtro de 0.2 micras. Tomar 50 μ L de IL-3 + 4950 μ L de PBS-Alb 0.1% = 5000 μ L que contienen 500 ng de IL-3, colocar en viales rotular con 50 ng en 500 μ L. Conservar en refrigeración a -20 °C.

V. Preparación del colorante Azul Tripano

Para las pruebas de viabilidad y conteo celular se empleó una dilución del colorante azul tripano (Sigma, Chem, USA) al 0.3% en PBS 1X. Antes de su uso la dilución del colorante fue filtrada haciéndose pasar a través de un filtro Whatman del número 2. Conservar a temperatura ambiente.

APÉNDICE B

TINCIÓN CON GIEMSA

Reactivos.

1.- Solución stock:

Disolver 50 mg de Giemsa en 5 mL de metanol absoluto (Cubrir de la luz).

2.- Solución de tinción:

Tomar 1 mL de la solución stock y diluir con 9 mL de agua destilada. (Preparar al momento de la tinción).

Procedimiento:

1. Preparación de la muestra
2. Tomar una alícuota de 30–40 μL y colocarla en la camisa para la centrífuga (Shandon Southern cytopspin).
3. Colocar el portaobjetos y la camisa en la centrífuga.
4. Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos.
5. Dejar secar.
6. Teñir con la solución de tinción por 10 a 15 minutos.
7. Lavar con agua destilada, y dejar secar.

Criterios para determinar la morfología.

Observar la morfología y distinguir las células diferenciadas de los blastos. Los monocitos presentan tamaño mayor al de los blastos, la intensidad de coloración del citoplasma es menor, el núcleo puede ser excéntrico e indentado y disminuye la porción núcleo/citoplasma. Los granulocitos-neutrófilos comparten las características de los monocitos excepto que su tamaño es semejante a los blastos y en el estadio en banda el núcleo tiene forma de dona.

APÉNDICE C

ANÁLISIS CITOQUÍMICO

Tinción α -Naftil acetato esterasa para monocito-macrófago.

REACTIVOS.

1. - Alfa-Naftil acetato.

2. - Solución fijadora (estable por dos meses, 4-6°C).

Disolver 60 mg de acetato de sodio (CH_3COONa) en 60 mL de acetona (CH_3COCH_3), adicionar 40 mL de agua destilada y 70 μL de ácido acético (CH_3COOH).

3.- Solución de pararosanilina (estable por dos meses, 4-6 °C).

Disolver 1 gr de pararosanilina en 25 mL de ácido clorhídrico (HCL) 2N, realizarlo en caliente (baño maría) filtrar cuando esté a temperatura ambiente.

4.- Solución de Nitrito de Sodio.

Disolver 1 gr. de Nitrito de Sodio (NaNO_2) en 25 mL de agua destilada.

5.- Solución de fosfatos 0.2 M pH 7.0-7.1.

a) Disolver 11.9 gr de Fosfato diácido de sodio monohidratado $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 500 mL de agua destilada.

b) Disolver 14.196 gr. de Fosfato monoácido de sodio Na_2HPO_4 en 500 mL de agua destilada.

* Mezclar 250 ml de la solución **b** con 130 ml de la solución **a**.

6.- Hematoxilina de Meyer (Sigma USA).

7.- Suero fisiológico. Cloruro de sodio (NaCl) al 9%.

PROCEDIMIENTO

1.- Fijar los extendidos con la solución fijadora durante un minuto, y lavar con suero fisiológico.

2.- Incubar durante 60 minutos en la siguiente solución:

a) Mezclar 50 μ L de la solución de Nitrito de Sodio y 50 μ L de la solución de pararosanilina. Mezclar las dos soluciones durante un minuto, después adicionar 5 mL de la solución de fosfatos 0.2 M.

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 0.2 M.

*Mezclar las dos soluciones y filtrar.

Después del tiempo transcurrido lavar con agua destilada.

3.- Teñir 10-30 minutos, con hematoxilina de Meyer.

Lavar abundantemente con agua destilada.

*En las células positivas se observa un precipitado difuso color marrón en el citoplasma

*Se utilizó como control positivo la línea celular de tipo monocito-macrófago P-388 y J-774.

APÉNDICE D

ANÁLISIS CITOQUÍMICO

Tinción cloroacetato esterasa para granulocito-neutrófilo.

REACTIVOS

1. - Naftol-ASD Cloroacetato (estable por dos meses, 4-6°C).

Disolver 5 mg de Naftol-ASD Cloroacetato en 2.5 mL de N-N Dimetil-formamida.

2. - Solución Fijadora pH 6.6 (estable por más de dos meses, 4-6 °C).

Disolver en 30 mL de agua destilada: 20 mg de Fosfato monoácido de sodio Na_2HPO_4 , 100 mg de Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), 45 mL de acetona (CH_3COCH_3) y 25 mL de Formaldehído (CH_2CO_2).

3.- Solución de Fuccina nueva (estable por 2 meses, a temperatura ambiente).

Disolver 1 gr de Fuccina en 25 mL de ácido clorhídrico (HCl) 2N, realizarlo en caliente (baño maría) filtrar cuando alcance la temperatura ambiente.

4.- Solución de Nitrito de Sodio (NaNO_2) (estable 7 días, 4°C).

Disolver 1 gr de Nitrito de Sodio en 25 mL de agua destilada.

5.- Solución de fosfatos pH 7.73.

Disolver 0.852 gr de Fosfato monoácido de Sodio (Na_2HPO_4) y 0.09 gr de Fosfato diácido de Potasio (KH_2PO_4) en 100 mL de agua destilada.

6.- Hematoxilina de Meyer (Sigma USA).

7.- Suero Fisiológico. Cloruro de Sodio (NaCl) al 0.9 %.

PROCEDIMIENTO

1.- Fijar los extendidos con la solución fijadora durante 30 segundos y lavar con suero fisiológico.

2.- Incubar durante 30 minutos en la siguiente solución:

a) Tomar 50 μ L de la solución Nitrito de Sodio y 50 μ L de la solución de Fuccina nueva. Mezclar las dos soluciones durante un minuto, adicionar 9.5 mL de la solución de fosfatos pH 7.73, después agregar 0.5 mL de la solución de naftol AS-D- Cloroacetato.

Lavar con agua destilada.

3.- Teñir 10-30 minutos con hematoxilina de Meyer. Lavar abundantemente con agua destilada.

* En las células positivas se observa gránulos rojos brillantes en el citoplasma.

* Se utilizo como control positivo granulocitos de médula ósea de ratón CD-1.