



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

PARTICIPACIÓN DE INHIBIDORES
HEMATOPOYÉTICOS EN EL BLOQUEO DE LA
PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MIELOIDE
MULTIPOTENCIAL 32D DE RATÓN TRATADA CON
CASEINATO DE SODIO (CasNa).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Edgar Ledesma Martínez

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MÉXICO, D.F.

enero 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FES-Zaragoza) UNAM; bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio y la supervisión del comité tutorial integrado por los doctores María de Lourdes Mora García y Eduardo García Zepeda.

Durante la realización de la presente tesis se contó con el apoyo del Programa de Becas para Estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 182459 y del Programa de Becas para Estudios de Posgrado en la UNAM.

La realización de la investigación fue apoyada por el proyecto PAPIIT IN214903-2 de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA).

“Establish what your questions are before you go looking for answers”

Doc Axel Brass

.

INDICE

| | |
|---|----|
| Abreviaturas..... | 7 |
| Resumen..... | 8 |
| Abstract..... | 9 |
| Introducción..... | 10 |
| Hematopoyesis..... | 10 |
| Factor de Necrosis Tumoral alfa..... | 13 |
| Factor de Crecimiento Transformante beta 1..... | 17 |
| CCL3/MIP-1 α | 21 |
| Interferón alfa..... | 24 |
| La caseína..... | 29 |
| Línea celular 32D..... | 31 |
| Planteamiento del problema..... | 32 |
| Justificación..... | 33 |
| Hipótesis..... | 34 |
| Objetivo..... | 35 |
| Objetivos particulares..... | 35 |
| Metodología..... | 36 |
| Líneas celulares..... | 36 |
| Citocinas recombinantes y anticuerpos..... | 36 |
| Objetivo 1..... | 37 |
| Evaluación de la proliferación..... | 37 |
| Evaluación de viabilidad..... | 37 |
| Diferenciación celular..... | 38 |
| Diferenciación morfológica:..... | 38 |
| Citometría de flujo:..... | 39 |
| Objetivo 2..... | 40 |
| Expresión de genes de las citocinas inducidas por el CasNa..... | 40 |
| Objetivo 3..... | 42 |
| Ensayo de ELISA para detectar la presencia de TNF- α , TGF- β , CCL3/MIP-1 α o IFN- α | 42 |
| ELISA para TNF- α | 42 |
| ELISA para TGF- β | 42 |
| ELISA para CCL3/MIP-1 α | 43 |
| ELISA para IFN- α | 43 |
| Objetivo 4..... | 44 |
| Bloqueo de factores..... | 44 |
| Manejo de Datos..... | 44 |
| Resultados..... | 45 |
| El CasNa bloquea la proliferación de las células 32D sin afectar la viabilidad celular favoreciendo la diferenciación macrofágica..... | 45 |
| El CasNa incrementa la expresión de mRNA para TNF- α e IFN- α , pero no CCL3/MIP-1 α o TGF- β 1 en las células 32D..... | 50 |
| El CasNa induce la producción de TNF- α y CCL3/MIP-1 α a la vez que incrementa la de TGF- β en las células 32D..... | 53 |
| El rmTNF- α , rhTGF- β 1 y rmIFN- α pero no el rmCCL3/MIP-1 α reducen la proliferación de 32D sin afectar la viabilidad celular..... | 54 |
| El bloqueo de la proliferación de las células 32D tratadas con CasNa, es parcialmente mediado por el TNF- α | 57 |

| | |
|---|----|
| Discusión de resultados..... | 62 |
| Objetivo 1. Evaluar el efecto del CasNa en la proliferación, viabilidad y diferenciación de la línea celular 32D..... | 62 |
| Objetivo 2. Detectar la expresión de mRNA de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en las células 32D tratadas con CasNa..... | 63 |
| Objetivo 3. Detectar la producción de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en las células 32D estimuladas con CasNa..... | 64 |
| Objetivo 4. Evaluar la participación de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en el abatimiento de la proliferación celular de 32D..... | 66 |
| Conclusión..... | 70 |
| Apéndice..... | 71 |
| RT-PCR..... | 71 |
| Análisis de imagen..... | 71 |
| ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)..... | 72 |
| ELISA para TNF- α | 72 |
| ELISA para CCL3/MIP- α | 72 |
| ELISA para TGF- β | 72 |
| ELISA para IFN- α | 72 |
| Extracción de células totales de bazo de ratón..... | 73 |
| Ensayo de quimiotaxis..... | 73 |
| Referencias..... | 74 |

Abreviaturas.

| | |
|--------------------------|---|
| anti-CCL3/MIP-1 α | anticuerpo anti-proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa |
| anti-IFN- α | anticuerpo anti-interferón alfa |
| anti-TNF- α | anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa |
| BMP | proteína morfogenética de hueso |
| CCL2/MCP-1 | proteína quimiotáctica de monocitos 1 |
| CCL3/MIP-1 α | proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa |
| cDNA | ácido desoxiribonucleico complementario |
| CFU-GM | unidades formadoras de colonias de granulocito-macrófagos. |
| CXCL10/IP-10 | proteína 10 inducible por interferon |
| CXCL2/GRO- β | proteína inflamatoria de macrófagos-2 beta |
| CXCL4/PF-4 | factor derivado de plaquetas 4 |
| CXCL8/IL-8 | interleucina-8 |
| ELISA | inmunoensayo acoplado a una enzima. |
| EPO | eritropoyetina |
| G-CSF | factor estimulador de colonias de granulocitos |
| GM-CSF | factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos |
| HRP | peroxidasa de rábano |
| IFN- α | interferón alfa |
| IFN- γ | interferón gamma |
| IL-1 β | interleucina-1 beta |
| IL-2 | interleucina-2 |
| IL-3 | interleucina-3 |
| IL-6 | interleucina-6 |
| IL-6 | interleucina-6 |
| LAP | proteína asociada a latencia |
| LTBP | proteína enlazada a TGF- β latente |
| LIF | factor inhibidor de leucemia |
| LPS | lipopolisacárido |
| MC | medio condicionado |
| mRNA | ácido ribonucleico mensajero |
| ng | nanogramo |
| pb | pares de bases |
| PBS | solución estabilizadora de fosfatos |
| RNA | ácido ribonucleico |
| rpm | revoluciones por minuto |
| RT-PCR | transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa |
| SB431542 | 4-[4(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]benzamida |
| SCF | factor de células tallo |
| TGF- β 1 | factor de crecimiento transformante beta 1 |
| TNF- α | factor de necrosis tumoral alfa |
| TPO | trombopoyetina |
| TRAIL | Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado a TNF |
| uL | microlitro |

Resumen.

Se ha mostrado que el caseinato de sodio (CasNa) inhibe la proliferación de la línea hematopoyética mieloide 32D de ratón promoviendo su diferenciación hacia macrófagos (Ramos *et al*, 2004). Sin embargo, se desconoce si la inhibición de la proliferación es mediada por la inducción de citocinas supresoras de la hematopoyesis.

Por lo tanto, se evaluó el mRNA para TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en cultivos de células 32D con y sin tratamiento de CasNa, encontrándose que expresan de manera constitutiva estos genes. Sin embargo, el tratamiento de 2 mg/mL de CasNa incrementa la expresión para TNF- α e IFN- α , mientras que no parece modular la de TGF- β 1 y CCL3/MIP-1 α . Por otro lado, las células 32D producen de manera constitutiva TGF- β 1, no así TNF- α o CCL3/MIP-1 α , mientras que el estímulo de CasNa incrementa de manera significativa la síntesis de TGF- β 1 a la vez que induce la producción de TNF- α y CCL3/MIP-1 α en tanto que no hay evidencias de modulación de IFN- α .

Finalmente, se determinó que el TNF- α secretado por estímulo de CasNa, media de manera parcial la supresión de la proliferación inducida por CasNa, en tanto el resto de las citocinas no parecen tener intervención en la inhibición de la proliferación. En cuanto a la inducción de diferenciación, no existen evidencias de que alguna de estas citocinas sea la responsable de la diferenciación hacia macrófagos. En conjunto, los resultados muestran que el CasNa es capaz de inducir la expresión de reguladores hematopoyéticos (TNF- α , TGF- β 1 y CCL3/MIP-1 α), de los cuales solo TNF- α tiene un papel importante en el mecanismo de acción de CasNa.

Abstract.

Previous works at this lab has been shown that sodium caseinate (CasNa) inhibit the proliferation of murine hematopoietic myeloid 32D cell line inducing differentiation into macrophage cells (Ramos *et al*, 2004). However, is not yet known whether inhibition of proliferation is mediated through the hematopoietic cell growth-regulating cytokines induction.

Therefore, the expression of mRNAs for TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α and IFN- α in culture in the presence or absense of CasNa was determined, the results show that 32D cell line consitutively express these mRNAs. However, treatment with 2 mg/mL of CasNa upregulate expression for TNF- α and IFN- α , whereas seem do not modulate TGF- β 1 and CCL3/MIP-1 α expression. Another hand, 32D cells constitutively produce TGF- β 1, but not TNF- α or CCL3/MIP-1 α , while CasNa stimulus upregulate significantly the secretion of TGF- β 1, at the same time that arise the TNF- α and CCL3/MIP-1 α production, whereas there are no evidences for IFN- α modulation.

Finally, TNF- α induced by CasNa was determined mediates partially supression of proliferation induced by CasNa, whereas other else cytokines seem not to have a rol in the proliferation inhibition. About the diferentiation induction, there are not evidence that anyone of these cytokines being macrophage cells differentiation responsible. Take together, the results shown that CasNa was able to inducing the hematopoietic regulators expression (TNF- α , TGF- β 1 and CCL3/MIP-1 α), from wich only TNF- α play a relevant role into action mechanism of CasNa.

Introducción.

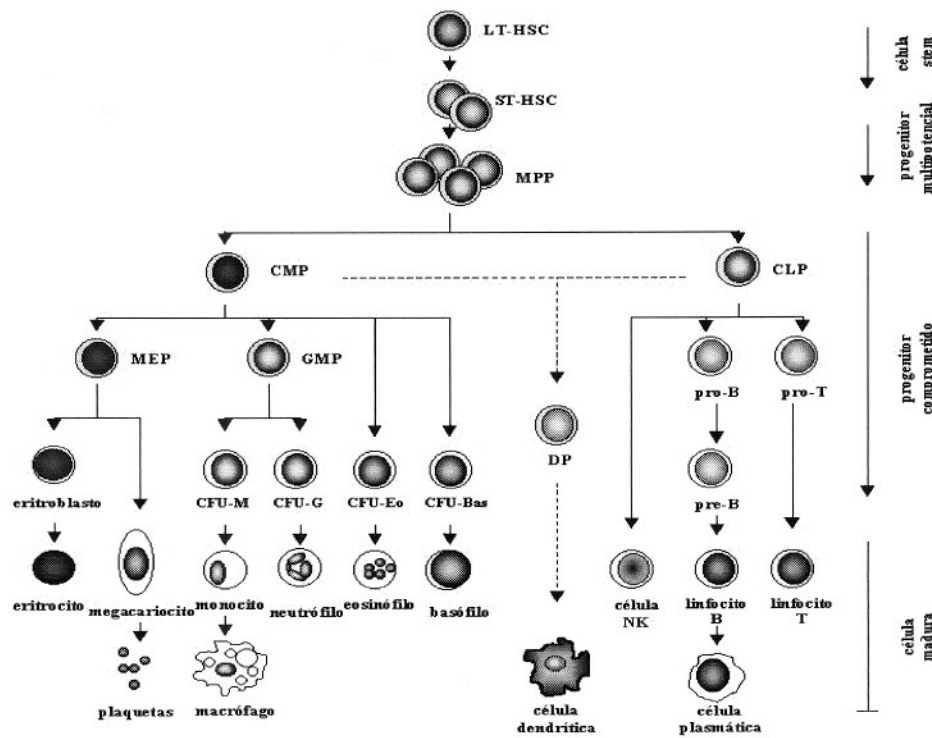
Hematopoyesis.

Las células sanguíneas tienen como principal función el transporte de oxígeno y la defensa del organismo contra la invasión de agentes patógenos. Las células sanguíneas maduras (eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas) mueren por senescencia o bien durante el desarrollo de sus funciones normales (Hughes-Jones & Wickramasingh 1991), siendo su número restituido por la formación de nuevas células sanguíneas mediante el proceso conocido como hematopoyesis (Figura 1) (Orkin 1995).

La producción de células sanguíneas en el humano inicia en el saco vitelino durante los primeros 14 a 19 días de vida embrionaria, el hígado y bazo fetal se convierten en los principales órganos hematopoyéticos en el segundo trimestre de embarazo y la médula ósea fetal hacia el tercer trimestre. Después del nacimiento la médula ósea es el principal sitio hematopoyético en individuos sanos. Así y durante los primeros cuatro años de vida, la médula de todos los huesos contribuye a la hematopoyesis (Munker *et al*, 1998), mientras que en la edad adulta, debido al incremento de células adiposas en ciertas regiones de la médula, el proceso queda restringido a los huesos pélvicos, columna vertebral, fémur, húmero, cráneo y esternón (Hughes-Jones & Wickramasingh 1991).

Las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente constituido por distintos tipos celulares y proteínas extracelulares que en su conjunto forman el microambiente hematopoyético. Las células que constituyen éste microambiente son conocidas como células del estroma medular y entre ellas se encuentran principalmente: fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipocitos. Su principal función es proveer el microambiente propicio para favorecer la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Las células del estroma medular secretan proteínas como la colágena, fibronectina, laminina y los proteoglicanos que constituyen la matriz extracelular, mientras que las proteínas que regulan la fisiología de las células hematopoyéticas y sus precursores son llamadas citocinas (Munker *et al*, 1998).

Figura 1. Hematopoyesis.



Tomado y modificado de Larsson & Karlsson 2005; Weissman 2000.

LT-HSC (célula stem hematopoyética reconstituyente a largo plazo), ST-HSC (célula stem hematopoyética reconstituyente a corto plazo), MPP (progenitor multipotencial), CLP (progenitor linfoide común), CMP (progenitor mieloide común), MEP (progenitor megacariocito/eritroide común), GMP (progenitor granulocito/macrófago), DP (progenitor dendrítico), CFU (unidad formadora de colonias).

La hematopoyesis es sustentada por la proliferación y diferenciación de un grupo de células conocido como células stem (tallos) hematopoyéticas (Orkin 1995). Estas células se concentran principalmente en el estroma de la médula ósea y constituyen el 0.05% de esta población celular, 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 citoquímicas propias de las células maduras o comprometidas hacia algún linaje celular. Estas células son consideradas totipotenciales debido a que estimuladas con la combinación de diferentes citocinas pueden comprometerse hacia cualquiera de los linajes celulares sanguíneos, además tienen la

capacidad para reconstituir la hematopoyesis a corto y largo plazo, en individuos mielosuprimidos después de una radio o quimioterapia (Morrison *et al*, 1995).

Históricamente, cultivos *in vitro* permitieron establecer que las células precursoras hematopoyéticas provenientes de la médula ósea de ratón, solo proliferaban en presencia de células estromales o de medios condicionados (MC) de cultivos de células pertenecientes al estroma de médula ósea (Pluznik & Sachs 1965), posteriormente se demostró que la proliferación de estas células estaba sustentada por factores glicoprotéicos presente en el MC. De esta manera la hematopoyesis está regulada por una serie de glicoproteínas conocidas como factores de crecimiento hematopoyético e interleucinas (Metcalf 1998) las cuales son miembros de la familia de las citocinas.

Las citocinas pueden ser categorizadas de acuerdo a su papel como proteínas estimuladoras, supresoras o co-estimuladoras. Estas acciones son mediadas a través de receptores específicos los cuales transmiten una serie de secuencias intracelulares, que dan a la célula la información necesaria para sobrevivir o morir, proliferar o diferenciarse o en el caso de las células stem autorenovarse o no (Broxmeyer *et al*, 2001). Así para las células progenitoras, la presencia de interleucina-3 (IL-3), factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF), de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina (EPO) o trombopoyetina (TPO), es suficiente para su proliferación y diferenciación hacia células maduras (Clark & Kamen 1987).

Por otra parte, varias citocinas originalmente reconocidas como reguladoras de procesos inflamatorios o inmunes, han mostrado efectos como supresores de la proliferación a diferentes niveles dentro de la cascada hematopoyética (Broxmeyer *et al*, 2001), entre las mas reconocidas se tienen, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón alfa (IFN- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el ligando 3 de las CC quimiocinas (CCL3/MIP-1 α) (Jacobsen *et al*, 1994; Hamblin 1993; Chin *et al*, 2004; Trinchieri *et al*, 1987). Sin embargo, existen reportes que muestran el potencial inhibitorio de otras citocinas y quimiocinas entre las que destacan: IFN- γ (Jonasch & Haluska 2001), CXCL2/MIP-2 β , CXCL8/IL-8, CXCL4/PF-4, CCL2/MCP-1 (Youn *et al*, 1995; Broxmeyer *et al*, 1993; Sarris *et al*, 1993), CCL24/Eotaxina 2 (Patel *et al*, 1997), CCL9/MIP-1 γ (Hara *et al*, 1995), LIF (Wetzler *et al*, 1991), Timosina- β 4 (Li *et al*, 2000), IL-1 β (Ledesma *et al*, 2004), CXCL10/IP-10 (Sarris *et al*, 1993) y TRAIL (Plasilova *et al*, 2002).

Factor de Necrosis Tumoral alfa.

El término factor de necrosis tumoral se refiere a dos citocinas estrechamente relacionadas pero codificadas por genes distintos, conocidas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o cachectina y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) o linfotoxina. Ambas citocinas interactúan con los mismos receptores de membrana y ambas están implicadas en la respuesta del organismo contra algunas enfermedades (Tracey & Cerami 1994). El gen para el TNF- α codifica para una forma precursora bioactiva de 26 kDa (Jue *et al*, 1990), que enlazada a membrana está implicada en las actividades parácrinas del TNF- α en diversos tejidos. En respuesta a endotoxinas bacterianas, por ejemplo lipopolisacárido (LPS) y otros estímulos, la forma precursora es cortada por enzimas proteolíticas para generar la forma madura de 17 kDa (Pennica *et al*, 1984). Tres de estas formas monoméricas se asocian de manera no-covalente para formar un trímero, que es la forma bioactiva del TNF- α predominante en suero y fluidos corporales (Jones *et al*, 1989; Smith & Baglioni 1987).

Originalmente se consideraba que el TNF- α era exclusivamente producido por monocitos y macrófagos (Ferdy *et al*, 1998; Lange 1991), sin embargo se ha demostrado, al menos *in vitro*, que muchos tipos celulares son capaces de sintetizar TNF- α (Sidhu & Bollon 1993), por ejemplo, las células de leucemia promielocítica aguda, timocitos, linfocitos T y B, células NK, fibroblastos, (Hamblin 1993; Bharat & Jordan 1992) y recientemente se estableció que células CD34+ humanas expresan de manera constitutiva un gran número de genes entre ellos el del TNF- α (Janowska *et al*, 2001).

Existen dos tipos de receptores para TNF, el de tipo I (TNFR-55, p55) y del de tipo II (TNFR-75, p75), los cuales están presentes en la membrana plasmática de prácticamente todos los tipos celulares a excepción de eritrocitos y células T no estimuladas (Beyert & Fiers 1998; Lewis *et al*, 1991). Los receptores comparten homología estructural en el dominio extracelular de enlace a TNF así exhiben afinidades de unión similares (Smith *et al*, 1990; Thoma *et al*, 1990). La unión ligando-receptor, (tres receptores unidos al trímero activo de TNF) (Banner *et al*, 1993) activa una máxima respuesta celular con tan solo el 10% de los receptores de membrana enlazados al ligando. La internalización del TNF parece no ser necesaria en la activación celular (Engelmann *et al*, 1990) y varias rutas de señalización han sido descritas, de esta manera existe controversia acerca de si una ruta individual media una respuesta específica (Tracey & Cerami 1994).

La región citoplasmática de ambos receptores carece de regiones enzimáticas reconocibles, así su capacidad para transducir señales depende de la interacción con moléculas transductoras específicas

(Natoli *et al*, 1998), por ejemplo, en la ruta activada por TNF enlazado a p55, la proteína TRADD (Dominio de Muerte Asociado a TNFR) se une al receptor de manera ligando dependiente (Hsu *et al*, 1995), actuando como un adaptador cuya función es reclutar transductores *downstream* como FADD (Dominio de Muerte Asociado a Fas) y TRAF2 (Factor Asociado a TNFR) (Rothe *et al*, 1995a; Hsu *et al*, 1996) o RIP (Proteína de Interacción con el Receptor) (Hsu *et al*, 1996). Por otro lado p75 no parece reclutar a TRADD pero directamente interactúa con TRAF2, asociando a p75 con las rutas en las que se activa NF- κ B y JNK/SAPK (Figura 2) (Rothe *et al*, 1995b; Reinhard *et al*, 1997).

Mientras que FADD interactúa directamente con proteasas apoptóticas (caspasas) activando así la muerte celular, TRAF2 participa en la activación de NF- κ B y JNK/AP-1 (Hsu *et al*, 1996, Varfolomeev *et al*, 1996) por dos diferentes rutas. En la primera se requiere el reclutamiento de la proteína cinasa NIK (Malini *et al*, 1997), conduciendo a la fosforilación de I κ B α (subunidad inhibitoria de NF- κ B) en dos residuos de serina N-terminal (Ser 32/36); I κ B α fosforilado es entonces degradado liberando a NF- κ B el cual entra al núcleo y activa la transcripción (Hsu *et al*, 1996; Rothe *et al*, 1995b). La otra ruta, la cual es independiente de NIK (Song *et al*, 1997; Natoli *et al*, 1997), está asociada a la activación JNKs/SAPKs en la cual se activa la transcripción por fosforilación y activación de varios factores de transcripción entre ellos: c-Jun, ATF2 y TCF/Elk (Liu *et al*, 1996; Reinhard *et al*, 1997). Así, mientras que la apoptosis asociada a p55 requiere de la presencia de FADD, la inducción de la expresión génica ocurre principalmente por medio de rutas independientes de TRAF2 (Natoli *et al*, 1998). Por otro lado, FADD, también puede unirse a un adaptador llamado RAIDD (Duan & Dixit 1997), el cual se enlaza a RIP a través del motif CARD (Dominio de Reclutamiento de Caspasa) induciendo apoptosis (Herbein & O'Brien 2000).

Diversos estudios han relacionado el tipo de receptor expresado con la supresión hematopoyética inducida por el TNF- α , de esta manera se sabe que los receptores p55 y p75 están involucrados en la supresión de la proliferación de las células CD34+ y células Lin-Sca-1+ respectivamente (Rusten *et al*, 1994; Fahlman *et al*, 1994). Asimismo se ha intentado correlacionar la ruta metabólica activada ya sea por apoptosis o arresto en el ciclo celular con el tipo de receptor, sin embargo el papel de los receptores en la inhibición de la hematopoyesis no es del todo claro y en su mayoría controversial, por ejemplo el efecto apoptótico del TNF- α está bien documentado y principalmente mediado a través del receptor p55 (Baker & Reddy 1996; Yuan 1997; Zheng *et al*, 1995), así en las células T humanas de individuos adultos la expresión de p55 pero no

p75 incrementa la susceptibilidad a apoptosis inducida por el TNF- α (Aggarwal *et al*, 1999), sin embargo también se ha reportado que el receptor p55 esta involucrado en una ruta no apoptótica (Rath & Aggarwal 1999), mientras que el receptor p75 puede participar en la inducción de apoptosis (Baxter *et al*, 1999), o suprimir la proliferación sin muerte celular (Zheng *et al*, 1995).

El TNF- α muestra una amplia gama de efectos biológicos que en general no son especie-específicos (Aiyer & Aggarwal 1988). Su principal actividad *in vivo*, se refiere a la citotoxicidad sobre células tumorales que varía dependiendo de las condiciones de crecimiento y el grado de diferenciación (Kirstein *et al*, 1986), así en estudios *in vitro* actúa selectivamente sobre líneas celulares transformadas no teniendo efecto sobre células normales en cultivo, salvo excepciones en las que bajo ciertas condiciones inhibe la proliferación de fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y queratinocitos (Fransen *et al*, 1986; Sugarman *et al*, 1985). Dependiendo de la célula blanco y de la presencia de inhibidores metabólicos, puede inducir necrosis o muerte por apoptosis (Grooten *et al*, 1993; Schmid *et al*, 1986), asimismo está involucrado en la inducción y expresión de genes, en procesos inflamatorios, reparación de tejidos, respuesta inmune y hematopoyesis, mientras que se le ha detectado como agente importante en cuadros de artritis e infecciones víricas y bacterianas (Tabla 1).

Debido a su importancia como inmunomodulador y agente antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, se le ha examinado extensivamente como una alternativa terapéutica en tratamientos de cáncer, así en estudios preclínicos se ha administrado en combinación con otras citocinas y agentes quimioterapéuticos (Beyert & Fiers 1998), sin embargo sólo en muy pocos casos se han logrado actividades sinérgicas favorables y remisiones parciales (Negrier *et al*, 1992).

El papel del TNF- α en hematopoyesis se ha estudiado ampliamente y se reportan efectos tanto estimuladores como inhibidores, dependiendo del sistema y de la naturaleza de las células hematopoyéticas (Loetscher *et al*, 1991; Caux *et al*, 1990; Wisniewski *et al*, 1987). Es reconocido que además de sus efectos sobre la proliferación es un inductor de diferenciación (Kharbanda *et al*, 1990), en este sentido se ha reportado que es capaz de inducir la expresión de marcadores de diferenciación de linaje monocito/macrófago entre ellos el antígeno CD14 en células humanas (Weber *et al*, 1993), mientras que es un potente inductor de diferenciación hacia monocitos en las células tumorales U937 humanas (Hashimoto & Hanazawa 1990) y de leucemia mielomonocítica WEHI 3B de ratón (Leung *et al*, 1994; Mak *et al*, 1993). Asimismo se ha sugerido que induce la expresión del gen de M-CSF (Kharbanda *et al*, 1990), mientras que induce la secreción de M-CSF en monocitos humanos (Oster *et al*, 1987).

Aunque inicialmente se le identificó como un factor citotóxico y regulador negativo de la proliferación celular, posteriormente demostró propiedades estimuladoras del crecimiento en diversos tipos celulares (Digel *et al*, 1989; Vilcek *et al*, 1986), en este contexto se ha observado que puede actuar de manera sinérgica con GM-CSF o IL-3, para potenciar el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ humanas (Blackx *et al*, 1991; Caux *et al*, 1990). Adicionalmente el TNF- α incrementa la sobrevivencia de cultivos individuales de células Lin- Sca-1+ tratados con IL-1 β , incremento que se correlaciona con un aumento en el número de células viables y supresión de apoptosis (Neta *et al*, 1988).

A pesar de los estímulos positivos, el TNF- α es un reconocido supresor de la hematopoyesis *in vitro* que inhibe la proliferación de células progenitoras de médula ósea de ratón y humano en respuesta a la mayoría de las citocinas que se emplean como estimuladoras (Caux *et al*, 1990; Murphy *et al*, 1988). Sin embargo es importante tener en consideración que el grado de inhibición hematopoyética mediado por esta citocina es variable (Munker *et al*, 1998) y dependiente de la fracción celular separada de la médula ósea y del tipo de medio condicionado usado como fuente de factores de crecimiento hematopoyético, asimismo el efecto inhibitorio del TNF- α puede ser indirecto, esto es mediante la liberación de factores supresores por células accesorias (Beutler & Cerami 1989), los que pueden actuar de manera conjunta con el TNF- α para inhibir la hematopoyesis (Martínez-Jaramillo *et al*, 2001; Lu *et al*, 1999; Yamaguchi *et al*, 1999).

Factor de Crecimiento Transformante beta 1.

La familia del TGF- β consiste de cinco factores, tres de los cuales (β 1- β 3) son sintetizados en mamíferos, siendo el factor de crecimiento transformante beta 1 y beta 2 (TGF- β 1 y TGF- β 2) los más frecuentes; otras dos isoformas llamadas factor de crecimiento transformante beta 4 y beta 5 (TGF- β 4 y TGF- β 5) se han encontrado a nivel de mRNA en embriones de pollo y rana (*Xenopus laevis*) respectivamente (Jakowlew *et al*, 1988; Kondalah *et al*, 1990).

Las diferentes isoformas de TGF- β son sintetizadas como pro-proteínas precursoras de 392 aminoácidos que dimerizan durante la ruta secretora. Esta forma precursora es cortada en el aparato de Golgi en la posición 279 (Gentry & Nash 1990) y la región carboxilo terminal (aminoácidos 280-392) que constituye la forma madura de TGF- β permanece asociada con un polipéptido amino-terminal llamado LAP (péptido asociado a latencia) o β 1-LAP, creando un complejo latente (Saharinen *et al*, 1998). De esta manera, el TGF- β secretado es mantenido en un estado de latencia o inactividad que al ser reversible, funciona como un mecanismo de control que previene que la citocina ejerza una respuesta biológica hasta la conversión a la forma activa, proceso conocido como activación de TGF- β latente o formación de TGF- β (Gleizes *et al*, 1997).

La interacción entre TGF- β y LAP puede ser rota *in vitro* por incremento de temperatura (80°C por 10 minutos), dada la resistencia a la desnaturalización de la forma madura de TGF- β comparada con LAP (Brown *et al*, 1990), mientras que otros tratamientos fisicoquímicos que promueven la activación de TGF- β son el uso de detergentes o el pH ácido o básico; en este sentido se ha reportado que *in vivo*, la activación de TGF- β latente por osteoclastos durante la resorción de hueso, puede estar asociada a la acidificación (pH<3) en el espacio pericelular de los osteoclastos (Oreffo *et al*, 1989; Bonewald & Mundy 1989). Por otro lado, en la mayor parte de los casos, asociado al complejo latente i.e. la forma madura de TGF- β y LAP, se encuentra una glicoproteína de entre 120 y 240 kDa llamada LTBP (proteína enlazada a TGF- β latente) (Miyazono *et al*, 1988), la cual se une a LAP durante la secreción. Una excepción la constituyen los osteoblastos de rata, los cuales secretan TGF- β que carece de LTBP (Dallas *et al*, 1994). A pesar de que LTBP no parece ser necesaria en la condición de TGF- β como complejo latente, se ha sugerido que puede participar en la ruta de activación. Así, se ha propuesto que después de la secreción, el complejo latente de TGF- β se incorpora a la matriz extracelular (ME) mediante LTBP por la acción de una transglutaminasa. En un primer corte proteolítico, LTBP es truncado por una proteasa de serina (plasmina) y el complejo latente se libera de la ME al mismo tiempo que se expone en LAP

residuos de manosa-6fosfato, por medio de los cuales al unirse vía el receptor de manosa-6fosfato/IGF-II presente en células endoteliales o de músculo liso, el complejo latente queda en disposición para un segundo corte proteolítico que trunca LAP y libera la forma madura de TGF- β (Gleizes *et al*, 1997). LTBP intacta, puede enmascarar residuos de manosa-6fosfato en LAP, previniendo que la forma latente de TGF- β se enlace al receptor manosa-6fosfato/IGF-II. Además, el complejo latente, es menos susceptible a la activación por plasmina (la proteasa probablemente involucrada en los dos cortes proteolíticos) cuando se asocia con LTBP. Por lo tanto, a pesar de que no es necesaria en la latencia, LTBP puede prevenir que el complejo latente forme interacciones inadecuadas con componentes de la ruta de activación de TGF- β (Gleizes *et al*, 1997). Por lo anterior, a pesar de que la mayoría de los estudios de la regulación de TGF- β están enfocados en la transcripción y traducción, la latencia parece ser un paso crítico en el control de la actividad de TGF- β , así un incremento en la expresión de TGF- β no siempre se correlaciona con un incremento en los niveles de TGF- β activo (Theodorescu *et al*, 1991).

Es comúnmente reportado que el TGF- β es producido por varios tipos celulares particularmente plaquetas, macrófagos activados, fibroblastos, células endoteliales (Touhami *et al*, 1997; Jacobsen *et al*, 1996) y recientemente se identificó en el medio condicionado de células CD34+ de médula ósea la expresión constitutiva de varios factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas entre ellas el TGF- β 1 (Janowska *et al*, 2001).

La familia de receptores para TGF- β 1 se divide en dos subfamilias: receptores de tipo I y receptores de tipo II con un alto nivel de similitud a nivel de secuencia, particularmente en el dominio cinasa (Massague 1998). Ambos son glicoproteínas de aproximadamente 55 y 70 KDa (receptor tipo I y tipo II respectivamente) (Dijke *et al*, 1993; Cheifetz *et al*, 1988) con dominio cinasa de serina/treonina (Matthews & Vale 1991) sin embargo, mientras que el receptor de tipo I fosforila su sustrato (las proteínas Smad) en residuos de serina, el receptor de tipo II se autofosforila y fosforila al receptor de tipo I en residuos de serina y treonina pero no tirosina (Lin *et al*, 1992; Souchelnytskyi *et al*, 1996), la autofosforilación del receptor de tipo II en tirosina se ha observado *in vitro* pero no *in vivo* (Lawler *et al*, 1997). Otra particularidad del receptor tipo I es una región altamente conservada de 30 aminoácidos proxima al dominio cinasa, llamada región dominio GS debido a que es rica en residuos de glicina y serina (Wrana *et al*, 1994).

En términos generales, cuando el ligando se une al receptor de tipo II, crea una combinación ligando-receptor con una alta afinidad por el receptor de tipo I. Se forma un complejo tetramérico en el que el receptor de tipo II fosforila al receptor de tipo I en sitios específicos de serina y treonina (próximos al dominio GS), formando el complejo activo y en consecuencia el receptor de tipo I fosforila a un miembro de la familia citosólica de las proteínas Smad transduciendo una señal (Dijke & Hill 2004).

Las proteínas Smad se engloban dentro de tres categorías funcionales: Smads activadas por receptor (R-Smads), la Smad común (Smad 4) y las Smads inhibitoras (I-Smads) (Heldin *et al.*, 1997). Las R-Smads (Smad 2 y Smad 3, como mediadores de la señalización de TGF/activina; Smad 1 y Smad 5 que activan la señalización por BMP, un miembro de la familia de TGF) son fosforiladas por el receptor de tipo I activado por el ligando, formando un heterodímero con Smad 4 que es traslocado al núcleo, interactuando directamente con secuencias específicas del DNA así como con factores de transcripción, coactivadores y correpresores para regular la transcripción de genes blanco de manera dosis dependiente y ligando específico. Las I-Smads (Smad 6 y Smad 7) actúan como inhibidores de la transducción de señales al interactuar con el receptor de tipo I, inhibiendo la fosforilación de las R-Smad, reclutando a la ligasa E3-ubiquitina degradando al receptor I activado o directamente al inactivar al receptor. De manera alternativa, las I-Smads pueden competir con Smad 4 en el anclaje a las R-Smads previniendo la formación de los complejos R-Smads/Smad 4 (Heldin *et al.*, 1997; Hata *et al.*, 1998).

Por otro lado, algunas otras proteínas se unen a los dímeros de Smad influenciando su capacidad de actuar en la transcripción. Así por ejemplo, el acceso de la Smad 1 al receptor es facilitada por proteínas auxiliares como SARA (Anclaje de Smad para la Activación de Receptor), mientras que complejos de Smad 7 y Smurf 1 (factor regulador de la ubiquitinación de la Smad) o Smurf 2 median la terminación de la señalización al promover poliubiquitinación y degradación del receptor activado (Figura 2) (Dijke & Hill 2004).

El TGF- β es una molécula pleiotrópica que puede ejercer efectos tanto positivos como negativos en proliferación, diferenciación o muerte celular, dependiendo del estadio de desarrollo de la célula blanco, si se trata de ambiente *in vivo* o del medio condicionado utilizado como fuente de citocinas para estudios *in vitro* (Fortunel *et al.*, 2000). De manera general el TGF- β está involucrado en el desarrollo de tumores, en la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos en lesiones cutáneas, en la regulación de apoptosis, en la síntesis de proteínas de matriz extracelular, en inmunosupresión y en

diversos estímulos positivos y negativos en una amplia variedad de tipos celulares (Tabla 1) (Flanders *et al*, 2003; Ruscetti *et al*, 1998; Grzegorzewski *et al*, 1994).

Es conocido que de entre los principales efectos biológicos mediados por el TGF- β se encuentra la inducción de diferenciación sobre células leucémicas y precursores de macrófagos humanos (Kamijo *et al*, 1990; Drexler *et al*, 1998; Ruscetti *et al*, 1998). Así por ejemplo se sabe que induce diferenciación hacia el linaje macrófágico en células de leucemia monocítica U937 y THP-1 y de leucemia mieloblastica ML-1 (Kamijo *et al*, 1990), mientras que parece tener poco efecto diferenciador sobre las células de leucemia promielocítica HL-60 (De Benedetti *et al*, 1990); es capaz de promover la maduración de células promonocíticas hacia macrófagos (Bombara & Ignatz 1992) e induce marcadores de diferenciación específicos de linaje monocito/macrófago en células de hígado fetal (Turley *et al*, 1996).

El papel del TGF- β como regulador negativo de la hematopoyesis se ha estudiado *in vivo* utilizando diferentes modelos en ratón (Kim & Letterio 2003; Fortunel *et al*, 2000) mientras que *in vitro* se ha estudiado extensivamente por medio de ensayos de colonias en medios semisólidos, sistemas de cultivo basados en estroma y cultivos líquidos de una sola célula tanto en sistemas humanos como de ratón (Fortunel *et al*, 2000). Es comúnmente aceptado que es de los principales reguladores de la quiescencia de células stem y progenitoras actuando directamente al regular negativamente la expresión de receptores de citocinas mitogénicas previniendo así la responsividad de las células a las señales de crecimiento (Fortunel *et al*, 2003) o bien, indirectamente a través del microambiente de la médula ósea. (Ruscetti & Bartelmez 2001).

El TGF- β actúa como un fuerte inhibidor de la proliferación de células progenitoras (Pascal *et al*, 1996), mientras que en células con cierto compromiso de diferenciación la inhibición puede ser menos evidente, debido a la presencia de células poco responsivas al factor (Keller *et al*, 1990). Es conocido que protege a células stem y progenitoras hematopoyéticas de tratamientos con altas dosis de 5-FU, de este modo ejerce un control negativo sobre el ciclo celular de células primitivas hematopoyéticas de ratón *in vivo* sin inducir muerte celular (Grzegorzewski *et al*, 1994). Se ha demostrado su capacidad para inhibir la formación de colonias por parte de progenitores multipotenciales humanos (CFU-Mix) y de ratón en medio semisólido (Jacobsen *et al*, 1991) mientras que frena la proliferación de células primitivas 32D de ratón (Cheng *et al*, 2001; Bang *et al*, 1996; Birchenall-Roberts *et al*, 1991).

CCL3/MIP-1 α .

El ligando CCL3 inicialmente descrito como “factor inhibidor de células tallo de ratón” y posteriormente “proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa” (MIP-1 α) (Parkinson *et al*, 1993; Menten *et al*, 2002), es una proteína enlazada a heparina de aproximadamente 6-8 kDa, miembro de la familia de las quimiocinas.

Las quimiocinas son moléculas estructuralmente relacionadas y definidas por la presencia de residuos de cisteína en la región N-terminal. Una subfamilia mayor comprende a las llamadas CXC quimiocinas debido a que dos cisteínas próximas al amino terminal están separadas por un solo aminoácido mientras que la otra gran subfamilia, llamada CC presenta dos residuos de cisteína adyacentes. Una excepción la constituyen los ligandos XCL1/linfotactina y CX3CL1/fractalcina, los cuales pertenecen a los grupos denominados C y CX3C respectivamente (Barrett & Rollins 1997; Oppenheim *et al*, 1991; Wolpe & Cerami 1989). Se han identificado varios receptores para las CC quimiocinas denominados CCR1 a CCR10 (Gao *et al*, 1993), de los cuales CCL3/MIP-1 α se une a dos de ellos (CCR1 y CCR5) (Broxmeyer & Kim 1999). De manera adicional, se han identificado diversas proteínas en humano con un alto grado de homología estructural y funcional a CCL3/MIP-1 α de ratón (Driscoll 1994; Graham *et al*, 1990).

En principio se le identificó como un factor secretado por macrófagos estimulados con endotoxinas, posteriormente se estableció que es producido por una amplia variedad de tipos celulares incluyendo neutrófilos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales (Cashman *et al*, 1998). En particular es secretado en el microambiente de la médula ósea en respuesta a diversos estímulos incluyendo IL-1 β y TNF- α (Taichman *et al*, 2000), en este sentido recientemente se le identificó de manera constitutiva en el medio condicionado de células CD34⁺ de médula ósea humana (Majka *et al*, 2001).

Las actividades y especificidades de las quimiocinas residen en el receptor al cual se unen. Estos receptores son una subfamilia de receptores enlazados a proteínas G caracterizados por siete dominios transmembranales con el extremo amino terminal extracelular y carboxilo citoplasmático. En este contexto, tres *loops* extracelulares y tres intracelulares están conectados para formar la unión con el ligando y proveer un entramado para la unión de proteínas G heterotrímeras lo cual conduce a múltiples funciones biológicas (Tae *et al*, 1998). La unión al receptor involucra una interacción de alta afinidad tras lo cual los eventos de la transducción de señales son iniciados por el complejo de proteínas G (Maurer & von Stebut 2004).

Cuando un GPCR (receptor acoplado a proteínas G) es activado por agonistas, heterotrímeros de proteínas G llevan a cabo su propia activación. En estado de reposo, la subunidad $G\alpha$ es una forma enlazada a GDP altamente asociada a $G\beta\gamma$. Después de la activación del receptor, $G\alpha$ se asocia a GTP disociándose en consecuencia de $G\beta\gamma$. De esta manera $G\alpha$ activada y $G\beta\gamma$ en forma libre promueven diferentes rutas de señalización (Neer 1994). $G\alpha$ induce la ruta de activación de PI3K (cinasa 3 de fosfoinositol) mientras que la subunidad $G\beta\gamma$ activa a la fosfolipasa C e induce flujo de Ca^{2+} resultando en la activación de la isoforma C de proteína cinasa. Se ha mostrado también que MAP cinasas así como señalización vía JAK/STAT están involucradas. Sin embargo y no obstante los amplios reportes acerca de las cascadas de señalización asociadas a receptores acoplados a proteínas G (Figura 2), los eventos *downstream* exactos inducidos por CCL3/MIP-1 α necesitan ser mejor caracterizados (Maurer & von Stebut 2004).

Los efectos biológicos mediados por CCL3/MIP-1 α así como los tipos celulares sobre los que actúa son diversos (Tabla 1). Es una molécula por definición quimiotáctica y activadora de monocitos, macrófagos y células T (Liesveld *et al*, 2000), es un importante mediador de la respuesta inflamatoria (Schall 1994) e inhibe la proliferación de células stem hematopoyéticas de ratón y humano (Sian *et al*, 1999).

Se ha demostrado que actúa sobre las células stem de ratón inhibiendo su entrada a la fase S del ciclo celular suprimiendo así la síntesis de DNA y subsecuentemente la proliferación (Clements *et al*, 1992). Suprime la formación de colonias de CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-E y CFC inducidas por GM-CSF y SCF (Broxmeyer *et al*, 2001; Cook 1996; Pascal *et al*, 1996), mientras que algunos estudios muestran que abate la formación de CFU-A (células formadoras de colonias en agar) y HPP-CFC (células formadoras de colonias de alto potencial proliferativo) (Broxmeyer *et al*, 1993; Eaves *et al*, 1993a). Existen reportes que señalan que el efecto de ésta quimiocina sobre las células stem y progenitoras es resultado de la interacción directa entre CCL3/MIP-1 α y la célula blanco (Keller *et al*, 1994; Lu *et al*, 1993), sin embargo considerando la complejidad dentro del microambiente de la médula ósea, se ha discutido si la acción de CCL3/MIP-1 α sobre células stem ocurre de manera indirecta, es decir, a través de las células que constituyen el estroma de la médula ósea (Eaves *et al*, 1993b). Por otro lado, algunos estudios sugieren que al suprimir la proliferación de las células stem mas primitivas las mantiene en condiciones que promueven su diferenciación (Verfaillie & Miller 1995; Verfaillie *et al*, 1994).

Como en el caso de las citocinas típicamente inhibitoras de la hematopoyesis, también se han reportado efectos duales para CCL3/MIP-1 α , dependiendo de la citocina empleada como estímulo para la formación de colonias *in vitro* (Keller *et al*, 1994) y de la procedencia de la célula progenitora, así por ejemplo la formación de CFC-GM por parte de células CD34+ de médula ósea es suprimida eficientemente, mientras que células CD34+ de cordón umbilical son estimuladas positivamente en el mismo rango de concentración (Wynter *et al*, 1998).

De esta manera, la capacidad de CCL3/MIP-1 α para inhibir la proliferación de células progenitoras es variable, particularmente *in vivo* actúa como un potente supresor hematopoyetico (Dunlop *et al*, 1992; Maze *et al*, 1992; Graham *et al*, 1990) mientras que *in vitro*, su capacidad como inhibidor es moderada (Lu *et al*, 1993; Broxmeyer *et al*, 1993) e incluso puede estimular la proliferación de progenitores mas comprometidos (Broxmeyer *et al*, 1990), actuando en sinergia con diversos factores de crecimiento para promover la proliferación de células progenitoras (Lord *et al*, 1993) y la formación de colonias en el caso de subpoblaciones de CFU-GM estimuladas con M-CSF o GM-CSF (Broxmeyer *et al*, 1990).

Finalmente, mientras que es capaz de suprimir la proliferación de células progenitoras normales, parece no afectar la proliferación de células leucémicas, esto es particularmente interesante *in vivo* donde CCL3/MIP-1 α protege únicamente a células stem normales contra el efecto de agentes citotóxicos (Lord *et al*, 1993).

Interferón alfa.

El interferón es un grupo heterogéneo de citocinas distinguibles unas de otras por diferencias inmunoquímicas y funcionales, además de ser codificadas por genes distintos (Bharat & Jordan 1992). Inicialmente clasificadas en función de su especificidad antigénica se reconocían tres categorías: alfa, beta y gamma que corresponden a la denominación previa de interferones de leucocitos, fibroblastos e inmunes (Díaz *et al*, 1993). Posteriormente se dividieron en dos grupos en función de su enlace a receptores comunes. Así, los IFN tipo I se enlazan al receptor tipo I e incluyen al interferón-alfa, interferón-beta, interferón-delta e interferón-kappa (IFN- α , IFN- β , IFN- δ e IFN- κ) (Chawla-Sarkar *et al*, 2003) y recientemente se ha incluido al ligando limitina o interferón-zeta (IFN- ζ) como miembro de los IFN tipo I, debido a su homología en secuencia con IFN- α e IFN- β y a su capacidad para unirse a los receptores de IFN, además de tener actividad antiviral, inmunomoduladora y antitumoral (Oritani & Kanakura 2005). Por otro lado, el IFN-gamma (IFN- γ) es el único representante del grupo de IFN tipo II debido a que se enlaza a un tipo distinto de receptor (Pfeffer *et al*, 1998; Haque & Williams 1998).

Mientras que el interferón del tipo II es sintetizado únicamente por células T y NK después de estímulos inmunológicos como por ejemplo, antígenos específicos de células T, enterotoxinas y estafilococos (Pestka 1997), prácticamente todos los tipos celulares sintetizan interferón de tipo I, siendo los leucocitos y fibroblastos las células típicamente productoras después de la exposición a virus, polipéptidos y citocinas (Sreevalsan 1995). No obstante, se ha podido identificar la expresión constitutiva de mRNA para IFN- α en células CD34+ humanas (Majka *et al*, 2001).

Se han reconocido trece genes funcionales que codifican para el IFN- α denominados como IFN- α 1, IFN- α 2... IFN- α 13, donde algunos de estos genes tienen a su vez variantes alélicas que en el caso de IFN- α 1 se designan como IFN- α 1a e IFN- α 1b. Estas variantes difieren unas de otras por el cambio de una base en la región codificante, conduciendo así a un cambio puntual en la secuencia de aminoácidos y la presencia de sitios de restricción (Hussain *et al*, 2000).

El IFN- α interactúa con el receptor tipo I el cual está compuesto de dos cadenas que dimerizan tras la unión del ligando. Después de la dimerización dos cinasas intracitoplasmáticas asociadas al receptor (JAK-1 y Tyk-2) son activadas conduciendo a la fosforilación del receptor y a proteínas STAT (Transductor de Señal y Activador de la Transcripción) en residuos de tirosina. Las STAT son una familia de factores de transcripción latentes involucrados en la transducción de señales de citocinas, hormonas y factores de crecimiento, las cuales median un amplio espectro de procesos

biológicos incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis, desarrollo fetal, inflamación y respuesta inmune (Ihle 1996; Imada & Leonard 2000; Takeda & Akira 2000).

Una vez activados los sitios fosforilados de tirosina del receptor, participan elementos de anclaje de homología Src (SH2) y proteínas conteniendo dominios de enlace a fosfotirosil presentes en la membrana o en compartimentos citoplasmáticos. Las STAT unidas al receptor son fosforiladas en tirosina cerca de la región carboxilo terminal, siendo ésta modificación quien libera a la STAT de la región citoplasmática para formar homo o heterodimeros por medio de interacciones recíprocas entre la tirosina fosforilada de una STAT y el dominio SH2 de otra STAT. Después de la dimerización, las STAT se translocan al núcleo interaccionando con elementos reguladores específicos para inducir la transcripción de un gen blanco (Caraglia *et al*, 2004). La activación del receptor de IFN de manera típica conduce a la fosforilación y activación de las STAT1 y STAT2, las cuales forman un heterodímero asociado a p48, un factor regulador del interferón (IRF), resultando en la formación de un complejo ISGF3 el cual, al traslocarse al núcleo inicia la transcripción de elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) (Figura 2). De esta manera el interferón a través de la interacción de ISGF3 con ISRE regula a nivel transcripcional una amplia variedad de genes (Darnell *et al*, 1994).

Aunque inicialmente se consideraba al IFN- α como una molécula con actividad exclusivamente antiviral, con el tiempo se reconoció que su capacidad para interferir con la replicación vírica era solo uno de múltiples efectos biológicos (Tabla 1) (Tilg 1997). Así, se ha mostrado que inhibe el desarrollo de tumores y modula algunas facetas del sistema inmune (Gresser 1997), es un importante regulador del crecimiento y diferenciación, afecta la comunicación celular y la transducción de señales, interviene en la progresión de enfermedades de tipo viral, angiogénicas, alérgicas y de origen inflamatorio (Tilg & Peschel 1996).

El IFN- α es un reconocido inhibidor de la proliferación e inductor de diferenciación en células hematopoyéticas normales y tumorales (Platanias & Fish 1999; Watanabe *et al*, 1996; Meager 1991). Es conocido que induce diferenciación hacia megacariocitos en células de leucemia megacariobástica aguda (AmegL) (Hassan *et al*, 1995) e incrementa la expresión de marcadores de diferenciación en células de leucemia humana HL-60 (Watanabe *et al*, 1996).

Debido a su condición pleiotrópica sobre una gran cantidades de células normales y malignas, aunado a la potente acción antiviral y de estímulo en la respuesta inmune humoral y celular (Matsui *et al*, 2003; Lau *et al*, 1996), el IFN- α es empleado en protocolos clínicos de hepatitis B y

hepatitis C, infecciones por virus del papiloma humano, virus de inmunodeficiencia humana, enfermedades del tracto gastrointestinal y diversos tipos de cáncer entre ellos, leucemia mieloide crónica (CML), mieloma múltiple y linfoma (Corssmit *et al*, 2000; Gresser 1997; Tilg 1997; Imanishi 1994).

En hematología, la efectividad clínica del IFN- α se ha comprobado empíricamente desde 1965, principalmente en síndromes proliferativos del tipo linfoide y mieloide como son la leucemia linfocítica crónica (CLL) y CML, mieloma múltiple, linfoma folicular entre otros (Lacotte-Thierry & Guilhot 2002; Kirkwood 2002; Harousseau 1997). Siendo la acción antitumoral resultado fundamental de su capacidad para suprimir la proliferación celular, vía la acción antagónica sobre factores de crecimiento hematopoyético (Billard 1993; Lauta 1995). Sin embargo, en la última década el impacto terapéutico del IFN- α es cada vez mas controversial debido a la frecuencia de efectos adversos a largo plazo, a la ocurrencia de células leucémicas resistentes a la terapia (Yamauchi *et al*, 2001) y la incidencia de toxicidad asociada a la terapia con IFN a nivel hepático, hematológico y neuropsiquiátrico; trastornos que impactan negativamente la calidad de vida del paciente y su capacidad para responder favorablemente al tratamiento (Jonasch & Haluska 2001).

Así, el IFN- α ha conservado su estatus de efectividad terapéutica únicamente en casos de adquisición de remisión citogenética de CML y en linfomas del tipo folicular no-Hodgkin. Respecto a otras hemopatías, la pertinencia de su uso como agente terapéutico permanece a debate (Lacotte-Thierry & Guilhot 2002).

Figura 2. Rutas de señalización.

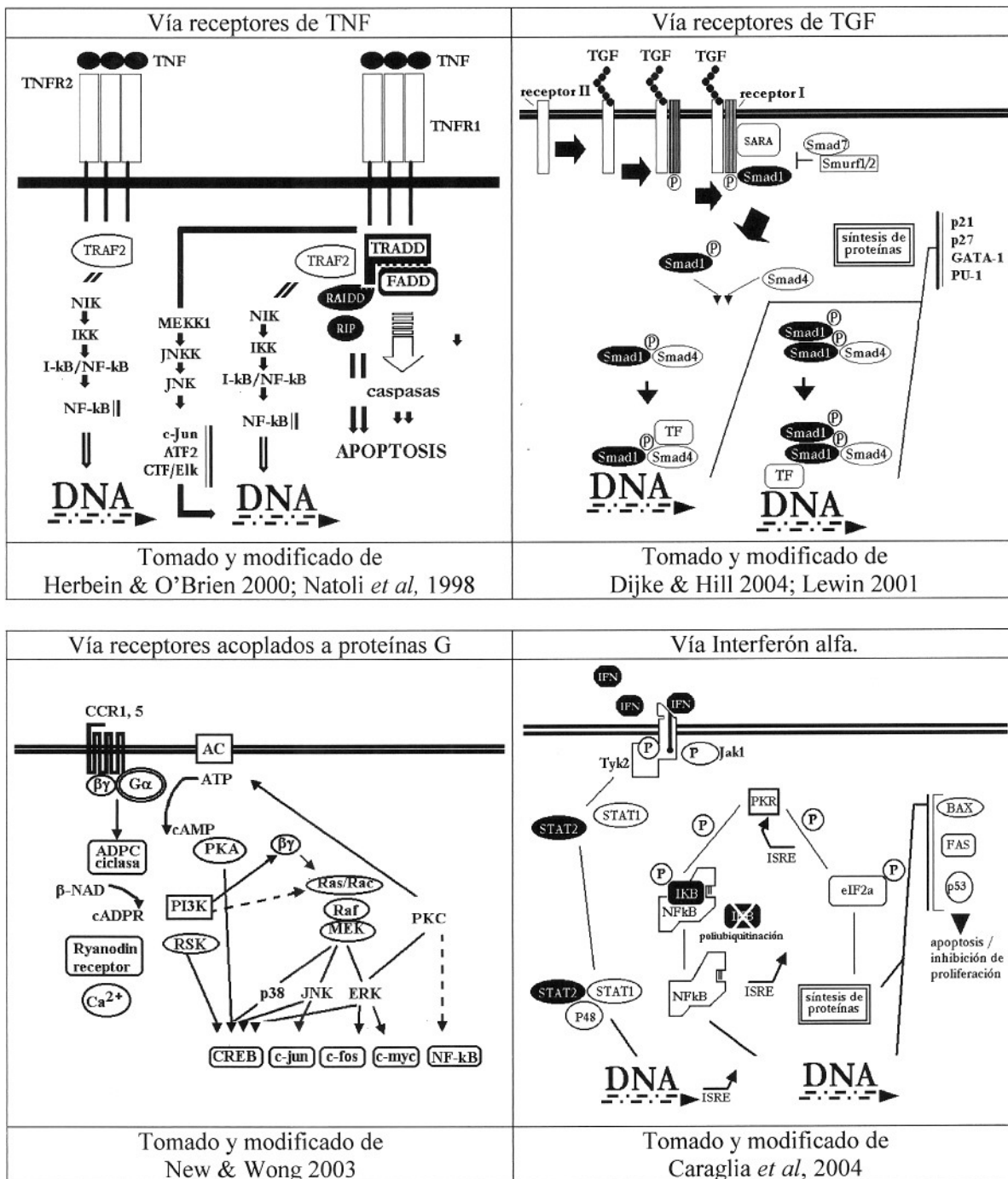


Tabla 1. Efectos biológicos del TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α .

| | TNF-α | TGF-β1 | CCL3/MIP-1α | IFN-α |
|----------------------------|---|---|--|---|
| Hematopoyesis | Suprime la proliferación de células precursoras humanas. Actúa como radio y quimioprotector. Potencia el crecimiento de células progenitoras humanas y de ratón, estimuladas con IL-3 o GM-CSF. | Abate la proliferación de precursores mieloides <i>in vivo</i> . La administración intrafemoral abate la proliferación de células de médula ósea. Actúa como quimioprotector en células progenitoras. | Suprime la proliferación de células progenitoras <i>in vivo</i> . Actúa como quimioprotector en células progenitoras. Induce proliferación en subpoblaciones de CFU-GM y maduración de células . | Abate la formación de colonias por parte de células stem. Inhibe la expresión de citocinas en células progenitoras. Antagoniza la acción de factores de crecimiento hematopoyético. |
| Antitumoral | Esta implicado en la regresión de tumores en modelos animales. Suprime <i>in vivo</i> el crecimiento de células tumorales. En algunos casos induce proliferación de AML. | Suprime el crecimiento de células tumorales. Algunos carcinomas y leucemias son estimulados positivamente. Induce diferenciación en células de leucémica monocítica y mieloblástica. | Efectivo mieloprotector <i>in vivo</i> después de tratamiento con cytarabina (Ara-C), hidroxiurea (HU) y fluoracil (FU). | Ampliamente usado en tratamiento de cáncer (sarcoma de Kaposi, CML, melanoma, linfoma). Estimula la síntesis de antígenos de superficie asociados a tumores. |
| Resorción de hueso | Estimula la resorción de hueso por acción directa en osteoblastos y células osteoclasticas. Suprime la síntesis de colágeno y fosfatasa alcalina en osteoblastos. | | | |
| Inmunidad | Actúa contra infecciones bacterianas mediante la activación de neutrófilos, monocitos y eosinófilos. Promueve el crecimiento de células T, induce receptores para IL-2 y síntesis de IFN- γ . | Suprime la proliferación de todas las clases de linfocitos. Inhibe secreción de IgG e IgM por parte de linfocitos B. Suprime la liberación de citocinas por parte de linfocitos T. | Activador y agonista de células NK, granulocitos y basófilos. Principal factor junto con MIP-1 β y RANTES en la supresión de HIV en asociación con linfocitos T CD4. | Potente antiviral en células de ratón, cerdo y bovino. Terapéutico en infecciones por VPH y VIH, enfermedades del tracto gastrointestinal, alérgicas y de origen inflamatorio. |
| Quimiotaxis | | Favorece la quimiotaxis de fibroblastos, neutrófilos y macrófagos en lesiones cutáneas. | Potente agonista de basófilos, induce un rápido cambio en la concentración de Ca ²⁺ citosólico. Quimiotáctica y activadora de granulocito-macrófagos y células NK y linfocitos T. | |
| Matriz extracelular | | Incrementa la síntesis y liberación de matriz extracelular en muchos tejidos y la síntesis de inhibidores de proteasas. Suprime la síntesis de enzimas proteolíticas que degradan la matriz. | | |

Tomado y modificado de Haitham *et al*, 2000; Chin *et al*, 2004; Menten *et al*, 2002; Chawla-Sarkar 2003

La caseína.

La leche y los productos lácteos son componentes importantes de la dieta humana aún en la etapa adulta e históricamente se le ha valorado por su aporte nutricional de aminoácidos (Koletzko *et al*, 1998). La leche bovina, la más frecuentemente consumida (Kon 1977), está constituida por 3.6% de proteínas, 4.1% de grasas, 5.0% de carbohidratos, menos del 1% de vitaminas y minerales y 86.6% de agua. De la fracción protéica compuesta por α -lactalbúmina, β -lactoglobulina y caseína, esta última es el principal componente con el 80% de la fracción (Walstra & Jenners 1984).

La caseína se encuentra incluida en forma de complejo salino, que al constituirse como partículas esféricas de dimensión no uniforme se les da el nombre de micelas. Está compuesta por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas por: α -S1 caseína, α -S2 caseína, β -caseína y κ -caseína, (Warner 1976; Hall 1971). La composición de la caseína varía de una especie a otra. En particular, la caseína humana es más rica en azufre, cistina y glúcidos que la caseína de vaca, este hecho se considera como una de las causas de la superioridad de la leche materna en la alimentación de los recién nacidos (Warner 1976).

La caseína es insoluble en agua sin embargo, al ser diluida en un álcali a pH 6.6 origina ciertos preparados solubles llamados caseinatos. El caseinato de sodio (CasNa) es producto de la disolución de la caseína en una solución de hidróxido de sodio, seguido de evaporación hasta que la humedad se reduce a un 4%; tras lo cual se obtiene un polvo blanco o incoloro, soluble en agua y sin sabor (Walstra & Jenners 1984). La industria para la elaboración de productos lácteos ha desarrollado varias preparaciones de caseína que se emplean en la alimentación. De entre ellas y debido a su alto valor nutricional, el caseinato de sodio frecuentemente es usado como fuente de proteínas en cereales y particularmente en productos dietéticos y en aquellos destinados para el consumo de bebés y pacientes con diabetes (Walstra & Jenners 1984; Warner 1976).

A pesar de que no existen evidencias directas de la participación de la caseína o su sal el CasNa en la hematopoyesis, desde hace algunos años se ha sugerido la intervención de las proteínas de la leche en procesos hematopoyéticos. Así, ratones con una dieta privada de proteínas pero suplementada con caseína, muestran recuperación de sus células hematopoyéticas (Aschkenasy 1971), mientras que el consumo de caseína en ratones induce un aumento en los niveles de eritropoyetina determinando así la restauración de la eritropoyesis (Okano *et al*, 1991).

Por otro lado, ratas alimentadas con caseína reducen el desarrollo de tumores de colon inducido por azoximetano, disminución que se ha sugerido involucra al sistema inmune (Tatsuta *et al*, 1992). Asimismo, el caseinato de sodio y la caseína, son agentes quimiotácticos que favorecen la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal de ratón induciendo así una respuesta inflamatoria (Pasotti *et al*, 1993). Además, existen datos que demuestran que el CasNa acelera la diferenciación de neutrófilos en banda a segmentados (Santiago *et al*, 1994).

Por otro lado, se ha reportado un incremento en la concentración de citocinas tipo factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y granulocitos (GM-CSF) en el suero y fluido de cavidad peritoneal de los ratones inyectados con CasNa, encontrándose además actividad formadora de colonias (Lotem & Sachs 1985). Se sabe que bloquea la proliferación favoreciendo una pronta diferenciación en células multipotenciales hematopoyéticas de ratón, superando la respuesta conseguida con citocinas inductoras de diferenciación (Ramos *et al*, 2000). En este sentido, recientemente se han dado evidencias de que el CasNa induce la producción del M-CSF en las células 32D de ratón, el cual tiene la capacidad de inducir la formación de colonias de linaje monocítico en cultivos de células mononucleadas extraídas de médula ósea de ratón (Ramos, *et al* 2004). Adicionalmente, se ha demostrado que induce la expresión del gen de al menos una citocina supresora de la hematopoyesis en el mismo modelo de células mieloides (González 2002).

Línea celular 32D

La línea celular 32D dependiente de interleucina-3 (IL-3), fue originalmente establecida apartir de un cultivo de médula ósea a largo plazo de ratones C3/HeJ, inyectados con un virus de leucemia Friend de ratón. Éstas células liberan al medio cantidades detectables de transcriptasa reversa, pero no virus que demuestren ser infectivos, además no inducen tumores cuando son inyectadas en ratones sanos compatibles (Greenberger *et al*, 1983). Expresan receptores para factores de crecimiento como por ejemplo IL-2 (Koyasu *et al*, 1996), IL-4 (Lowenthal *et al*, 1988), G-CSF (Inoue *et al*, 1998), eritropoyetina (Tsao *et al*, 1988); aunque también expresa receptores para quimiocinas como CXCL8/IL-8 y CXCL1/GRO- α (Sánchez *et al*, 1998) e incluso puede inducirse la expresión del receptor para GM-CSF (Kreider *et al*, 1990) y en estas condiciones inducir su diferenciación (Bigas *et al*, 1998).

Inicialmente se consideraba que sólo IL-3 podía favorecer la supervivencia y formación de colonias de células 32D (Metcalf 1985) sin embargo, estudios posteriores revelaron que algunas de estas células podían mantener cierta sobrevivencia y clonogenicidad aún en ausencia de IL-3, siempre y cuando estuviera presente en el medio G-CSF (Valtieri *et al*, 1987), asimismo, algunas de ellas son capaces de responder a GM-CSF y eritropoyetina (Migliaccio *et al*, 1989). En este sentido, además de proliferar en respuesta a factores de crecimiento, estas células conservan su capacidad para diferenciarse a distintos tipos celulares tales como basófilos (Migliaccio *et al*, 1989), granulocito-neutrófilos (Valtieri *et al*, 1987; Bigas 1998) y monocito-macrófagos (Kreider *et al*, 1990).

Por estas características, las células 32D han sido utilizadas como modelo de estudio de la hematopoyesis normal (Miller *et al*, 2004; Cheng *et al*, 2001; Russo *et al*, 1999; Sanchez *et al*, 1998; Boosalis *et al*, 1997) siendo el clon denominado 32D Cl3 uno de los más empleados para tal fin. Asimismo se le ha utilizado en estudios de los procesos de diferenciación mielóide mediados por factores de crecimiento (Harris *et al*, 1998; Inoue *et al*, 1998; Hu & Chien 1998; Xu *et al*, 1998).

Planteamiento del problema.

Recientemente se mostró que el CasNa inhibe la proliferación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D de ratón favoreciendo su diferenciación hacia macrófagos (Ramos *et al*, 2004), adicionalmente se demostró que incrementa la expresión de mRNA para TNF- α en éstas células (González 2002).

Por otra parte se han dado evidencias de que la producción de citocinas y quimiocinas inhibitoras de la hematopoyésis no está restringida a células maduras sino por el contrario, células primitivas son susceptibles de sintetizar estos factores (Janowska *et al*, 2001; Majka *et al*, 2001). De esta manera, a pesar de que existen indicios de la producción de supresores hematopoyéticos por parte del CasNa, se desconoce que factores están siendo secretados y si tienen participación en el mecanismo de acción del CasNa sobre células mieloides.

Por ello el presente trabajo tiene como finalidad definir si el mecanismo supresor de la proliferación e inductor de diferenciación celular promovido por el CasNa, es vía la liberación de citocinas y/o quimiocinas inhibitoras de la hematopoyesis.

Justificación.

En el campo de la oncología existe un innegable interés por la exploración de nuevas alternativas terapéuticas menos agresivas para el paciente, pero con un grado de efectividad similar o superior a la quimio o radioterapia. Entre las moléculas que han demostrado cierto potencial como reguladores hematopoyéticos se encuentran las caseinas sin embargo, la información disponible se refiere a células hematopoyéticas maduras no así en células progenitoras.

El caseinato de sodio ha demostrado ser un supresor de la proliferación celular y un efectivo inductor de diferenciación por encima de moléculas clásicas como el M-CSF, siendo por tanto un candidato muy interesante para estudios no solo a nivel de células hematopoyéticas normales sino también en el contexto de enfermedades oncológicas e infecciosas.

Las características de diferenciación inducidas por el CasNa así como la posible participación de citocinas reguladoras de procesos inmuno-hematológicos, obligan a un análisis mas profundo de los mecanismos de acción del CasNa en la hematopoyesis. Una vez esclarecido su marco de acción será factible investigar su uso terapéutico así como sus implicaciones en la salud.

Hipótesis.

Se ha mostrado que el CasNa inhibe la proliferación favoreciendo la diferenciación en las células mieloides multipotenciales 32D de ratón. Por otro lado, se ha evidenciado que células hematopoyéticas primitivas son susceptibles de sintetizar citocinas y quimiocinas inhibitoras de la hematopoyésis. Por lo anterior, se espera que el caseinato de sodio (CasNa) induzca la producción del Factor de Necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), Factor de Crecimiento Transformante beta 1 ($\text{TGF-}\beta 1$), $\text{CCL3/MIP-1}\alpha$ e Interferón alfa ($\text{IFN-}\alpha$), en las células 32D siendo estos factores los responsables de la inhibición de la proliferación e inducción de diferenciación.

Objetivo.

Determinar si el TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α o IFN- α son los responsables de la inhibición de la proliferación e inducción de la diferenciación de las células 32D tratadas con CasNa.

Objetivos particulares.

1. Evaluar el efecto del CasNa en la proliferación, viabilidad y diferenciación de la línea celular 32D.
2. Detectar la expresión de mRNA de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en las células 32D tratadas con CasNa.
3. Detectar la producción de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en las células 32D estimuladas con CasNa.
4. Evaluar la participación de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en el abatimiento de la proliferación celular de 32D.

Metodología.

Líneas celulares.

Para este trabajo se empleó la línea celular hematopoyética multipotencial 32D cl3 de ratón dependiente de interleucina-3 (IL-3). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClon UTA USA), adicionando 0.5 ng/mL de interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3), manteniéndose a una temperatura de 37° C y 5% de CO₂.

Citocinas recombinantes y anticuerpos.

Se utilizó interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3), factor de necrosis tumoral alfa recombinante de ratón (rmTNF- α), factor de crecimiento transformante beta 1 recombinante humano (rhTGF- β 1), CCL3/MIP-1 α recombinante de ratón (rmCCL3/MIP-1 α), interferón alfa recombinante de ratón (rmIFN- α), anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa de ratón (anti-TNF- α), anticuerpo anti-CCL3/MIP-1 α de ratón, anticuerpo anti-interferón alfa de ratón (antiIFN- α) (R&D Systems, USA), anticuerpo anti-fms (CSF-1R extracelular domian), su control de isotipo (*normal rabbit IgG*) y anticuerpo secundario (*goat anti-rabbit IgG (H+L) fluorescein conjugate*) (Upstate NY, USA), anticuerpo *FITC-conjugate rat anti-mouse Ly6G and Ly6C (Gr-1)* y su control de isotipo (*FITC-conjugate rat IgG2b,k*) (BD Biosciences Pharmingen San Diego CA,USA).

Para bloquear la señalización del factor de crecimiento transformante beta, se utilizó el inhibidor SB431542 de la actividad cinasa del receptor de tipo I del TGF- β (TGF β RI), 4-[4(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]benzamida (Tocris USA).

Objetivo 1.**Evaluación de la proliferación.**

El CasNa (Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA) se solubilizó en PBS (solución estabilizadora de fosfatos) y esterilizó por autoclave. Preparando una concentración stock de 100mg/mL, realizándose diluciones en PBS para llegar a las concentraciones de cultivo deseadas.

La proliferación de las células 32D con y sin tratamiento de CasNa se determinó mediante la técnica de incorporación del nucleótido timidina marcado con tritio [β - 3 H]dTTP al DNA en síntesis en las células en cultivo. La técnica permite cuantificar la síntesis de DNA utilizando la emisión de partículas beta por parte del nucleótido marcado, así, dado que la timidina se incorpora cuando ocurre la síntesis de DNA es posible estimar la cantidad de éste que se está sintetizando y en consecuencia, la proliferación celular.

Brevemente las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning NY, USA) a una densidad inicial de 2×10^4 células/mL en las condiciones antes señaladas; adicionándose al inicio del cultivo el CasNa y PBS como control del vehículo manteniéndose en condiciones de cultivo por 56 horas, momento en que se adicionó $1 \mu\text{Ci}$ de [β - 3 H]dTTP/mL timidina. Terminado el tiempo de cultivo (72 horas) se colocó la placa a -70°C por 24 horas, posteriormente se efectuaron dos rondas sucesivas de descongelación y congelación con el fin de liberar los núcleos y despegar la población adherente. Finalmente se cosechó, lavó y colocó las células en viales con 2 mL de líquido de centelleo (Beckman, USA), cuantificando la emisión de luz como cuentas por minuto (CPM) en un contador de emisión beta (Beckman Ls6500).

Evaluación de viabilidad.

Se determinó la viabilidad celular por la técnica de exclusión al azul tripano (Sigma, USA), como se describe previamente (Miller *et al*, 2004), se utilizó una proporción 1:1 de colorante y de muestra celular presentándose como porcentaje de células vivas (no teñidas con el colorante) en evaluaciones por conteo directo en hemocitómetro.

Diferenciación celular.

Diferenciación morfológica:

La diferenciación morfológica se evaluó después de realizar un frotis sobre un portaobjetos. Brevemente, el frotis se dejó secar por 5 minutos y posterior a su fijación con metanol se tiñó por 5 minutos con el colorante Giemsa (Sigma Co. USA).

Los criterios para determinar el estadio de diferenciación de las células 32D teñidas fue el siguiente (Diggs 1971; Cartwright 1973; McDonald *et al*, 1998):

1. Células inmaduras:

Blasto: células redondas o con algunas prolongaciones, núcleo redondo o ligeramente oval, citoplasma no granuloso y de color azulado. Relación núcleo citoplasma alta, casi todo el espacio es ocupado por el núcleo.

Promielocito/mielocito: aparición de granulos (oscuros o rojizos), relación núcleo citoplasma menor al blasto con inicio de aplastamiento del núcleo (puede ser oval).

Metamielocito: núcleo hendido (arriñonado), granulos rojizos. Relación núcleo citoplasma menor al promielocito/mielocito.

2. Células maduras

▪ Linaje granulocito neutrófilo:

Banda: núcleo en forma de banda no segmentado. Presencia de gránulos y relación núcleo citoplasma pequeña.

Neutrófilo polimorfonuclear: núcleo separado en lóbulos. Presencia de gránulos.

▪ Linaje monocito-macrófago:

Monocito: núcleo generalmenete redondo o reniforme, puede presentar circunvoluciones (aspecto de cerebro). El citoplasma puede ser gris-azulado mas claro que blastos y granulocitos y presentar pseudopodos y/o vacuolas digestivas. Relación núcleo citoplasma menor (presenta gran cantidad de citoplasma).

Citometría de flujo:

Se determinó la diferenciación por la expresión de antígenos de superficie mediante citometría de flujo. Brevemente, una vez concluido el tiempo de cultivo se cosecharon las células de cada tratamiento, el botón fue lavado y las células incubadas 30 minutos con la dilución de cada anticuerpo y posteriormente lavadas 2 veces. La cuantificación fue realizada en un citómetro de flujo (FACSCalibur). Para los lavados, diluir los anticuerpos y resuspender las células para su lectura se empleó PBS-SFB al 2%. Se evaluaron 10000 eventos y se emplearon controles de isotipo, IgG normal de conejo e IgG2b de rata conjugado a fluoresceína FITC.

Anticuerpo anti-Fms (CSF-1) dominio extracelular (antisuero de conejo). Este anticuerpo reconoce al receptor de M-CSF (CD115) presente en macrófagos y monocitos (Sunderkotter *et al*, 2004), se empleó IgG de conejo como control de isotipo y un anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo conjugado a fluoresceína FITC).

Anticuerpo conjugado a FITC, Ly-6G y Ly-6C (Gr-1) (antisuero de rata). Este anticuerpo reconoce a un dominio de Ly-6G expresado en granulocitos (Heston *et al*, 1991; Tepper *et al*, 1992). A pesar de que no se ha asignado CD (cluster of differentiation) la expresión de Ly-6G está directamente correlacionada con la diferenciación granulocítica (Tepper *et al*, 1992; Metcalf *et al*, 1997). Se empleó IgG2b,k de rata conjugado a fluoresceína FITC como control de isotipo.

Objetivo 2.

Expresión de genes de las citocinas inducidas por el CasNa.

La expresión de mRNA para las citocinas y quimiocinas inducidas por el CasNa se determinó mediante el ensayo de transcripción reversa acoplada de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Brevemente, mediante la técnica de extracción de RNA por Trizol (Invitrogen), se extrajo el RNA total a partir de 1.5×10^6 células cultivadas en presencia y ausencia de CasNa, éstas células se cosecharon y lavaron con 10 mL de PBS repitiéndose el lavado con 1 mL. Posteriormente las células fueron lisadas con 1 mL de Trizol (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que mantiene la integridad del RNA mientras las células se lisan y los componentes celulares se disuelven) conservando el lisado a -70° C hasta su extracción.

Para la extracción de RNA se emplearon 0.2 mL de cloroformo (la adición de cloroformo separa el lisado en una fase acuosa que contiene RNA y una fase orgánica con DNA y proteínas) separándose la fase acuosa (con RNA) a otro tubo eppendorf. Se precipitó con 0.5 mL de isopropanol, eliminándose el sobrenadante y lavando el RNA con 1 mL de etanol al 75% en agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato (agua DEPC). El botón de RNA extraído, se resuspendió en agua DEPC (0.01%).

Para determinar cualitativamente la integridad del RNA extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en amortiguador de TBE 1X, adicionando 4 uL de bromuro de etidio (10 mg/mL) por cada 100 mL de agarosa. La electroforesis es un método de separación para proteínas, ácidos nucleicos de acuerdo a su carga eléctrica, peso molecular, tamaño y forma, una vez que migran bajo la acción de un campo eléctrico. 4 uL del stock de RNA frío en 4 uL de amortiguador de carga para RNA, se colocaron en cada pozo del gel realizando el corrimiento electroforético a 70 volts, visualizándose el producto con un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (FotoDyne) distinguiéndose las bandas constitutivas de RNA ribosomal correspondiente a las bandas 18S y 28S, las cuales son una medida indirecta de la integridad del mRNA.

Para evaluar la concentración de RNA total de la extracción, se realizó una dilución 1:250 de los RNA's en agua desionizada y las diluciones fueron leídas en un espectrofotómetro (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey) de luz UV a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

El espectrofotómetro mide la cantidad de luz a una determinada longitud de onda que es transmitida por una muestra que contiene una o más sustancias absorbentes.

El RNA para cada muestra fue retrotranscrito a DNA complementario (cDNA) por la técnica universal de RT utilizando el kit Gene Amp RNA PCR (Perkin Elmer, USA). El proceso de RT consiste en la fabricación de una cadena de DNA complementario a partir de una plantilla de mRNA, mediante la enzima transcriptasa reversa. El volumen total de 10 μ L de reacción se incubó 60 minutos a 42° C, posteriormente 10 minutos a 90° C y por último 5 minutos a 4° C utilizando un termociclador (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey).

El producto de la RT fue amplificado mediante una mezcla de reacción para PCR con los primer sentido y antisentido para el control interno y primer sentido y antisentido para la citocina o quimicina de prueba (Tabla 2). El volumen final de reacción conteniendo la muestra se incubó un minuto y 45 segundos a 95° C, ligado a 35 ciclos de dos segmentos de 15 segundos a 95° C y 30 segundos a 60° C respectivamente, seguidos de 7 minutos a 72° C, ligado a 4° C en el termociclador (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey), para inactivar la enzima y alinear los productos.

| Citocina. | Primer. | | Referencia. |
|---------------------------|----------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| TNF- α 221 pb | Sentido | TCT CAT CAG TTC TAT GGC CC | Gross <i>et al</i> , 1998 |
| | Antisentido | GGG AGT AGA CAA GGT ACA AC | |
| TGF- β 1 406 pb | Sentido | CGG GGC GAC CTG GGC ACC ATC CAT GAC | Miller <i>et al</i> , 1999 |
| | Antisentido | CTG CTC CAC CTT GGG CTT GCG ACC CAC | |
| CCL3 200 pb | Sentido | ATG AAG GTC TCC ACC ACT GCC CTT GC | Baker <i>et al</i> , 2003 |
| | Antisentido | TTA GTC AGG AAA ATG ACA CCT GGC TGG G | |
| IFN- α 162 pb | Sentido | TGT CTG ATG CAG CAG GTG G | Schiavoni <i>et al</i> , 2000 |
| | Antisentido | AAG ACA GGG CTC TCC AGA C | |
| β -actina 238 pb | Sentido | GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG | Johnsen <i>et al</i> , 1998 |
| | Antisentido | GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG | |

Tabla. 2. Secuencias de oligonucleótidos (primer) sentido y antisentido para la citocina o quimicina de prueba (TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α) y control interno (β -actina). Se indica también el tamaño del producto en pares de base (pb).

En la electroforesis, se corrió el producto de PCR en un gel de agarosa como se menciona anteriormente para el RNA. Visualizándose el gel en el transiluminador de UV y los resultados fueron fotografiados en cámara CCD Foto/Analyst (FotoDyne).

Objetivo 3.**Ensayo de ELISA para detectar la presencia de TNF- α , TGF- β , CCL3/MIP-1 α o IFN- α .*****ELISA para TNF- α***

Se empleó el KIT KMC3012 de ELISA (Biosource, USA). Brevemente a una placa de 96 pozos previamente tratada con anticuerpo de captura anti-TNF- α se adicionaron 100 uL/pozo de buffer estándar, 100 uL/pozo de citocina recombinante en curva dosis respuesta comenzando en 1.2 ng/mL de rmTNF- α y 50 uL/pozo de buffer estándar mas 50 uL de sobrenadante a probar. Posteriormente se adicionaron 50 uL/pozo de anticuerpo biotin-conjugado incubando 90 minutos a temperatura ambiente.

Concluido el tiempo de cultivo se lavó cuatro veces con 400 uL/pozo de solución de lavado, retirando la humedad antes de adicionar 100 uL/pozo de estreptavidina-HRP, cubriendo e incubando por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó cuatro veces, adicionando 100 uL/pozo de cromogeno tetrametilbencidina (TMB) incubando 25 minutos en oscuridad. Finalmente se detuvo la reacción con 100 uL/pozo de solución de paro y leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Tecan).

ELISA para TGF- β

Se empleó el KIT KAC1688 de ELISA (Biosource, USA). Brevemente a una placa de 96 pozos previamente tratada con anticuerpo de captura anti-TGF- β multiespecies se adicionaron 200 uL/pozo de buffer estándar, 200 uL/pozo de citocina recombinante en curva dosis respuesta comenzando en 2 ng/mL de rhTGF- β y 200 uL/pozo de sobrenadante a probar previamente extraído (ver apéndice), se adicionaron 250 uL/pozo de buffer estándar y 50 uL/pozo de anticuerpo biotin-conjugado incubando 3 horas a temperatura ambiente.

Concluido el tiempo de cultivo se lavó cuatro veces con 400 ul de solución de lavado retirando la humedad previo a la adición de 100 uL/pozo de estreptavidina-HRP por 30 minutos. Posteriormente se lavó cuatro veces, adicionando 100 uL/pozo de TMB, incubando 25 minutos en oscuridad. Finalmente se detuvo la reacción con 100 uL/pozo de solución de paro y leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Tecan).

ELISA para CCL3/MIP-1 α

Se empleó el KIT CMC2204 de ELISA (Biosource, USA). Brevemente a una placa de 96 pozos tratada para alta adherencia (Corning Costar, USA) se adicionaron 100 uL/pozo de anticuerpo de captura diluido en buffer de captura A incubando por 12 horas a 4°C. Posteriormente se removió el exceso de humedad, adicionaron 300 uL/pozo de buffer de bloqueo incubando 2 horas a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se lavó 3 veces con 400 uL/pozo de solución de lavado, removiendo el exceso de humedad hacia el último lavado para luego, adicionar un positivo de quimiocina recombinante en curva dosis comenzando en 0.5 ng/mL de rmCCL3/MIP-1 α y 100 uL/pozo de anticuerpo de detección, incubando 2 horas a temperatura ambiente con agitación continua.

Terminada la incubación se lavó 3 veces con 400 uL/pozo de solución de lavado, removiendo el exceso de humedad antes de adicionar 100 uL/pozo de estreptavidina-HRP en dilución 1:3750, incubando por 30 minutos a temperatura ambiente en agitación continua. Finalmente se lavó 4 veces con 400 uL/pozo de solución de lavado, removió el exceso de humedad y adicionó TMB, incubando 30 minutos en agitación continua, por ultimo se detuvo la reacción con 100 uL/pozo de solución de paro y leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Tecan).

ELISA para IFN- α

Se empleó el KIT KMC4011 de ELISA (Biosource, USA). Brevemente a una placa de 96 pozos previamente tratada con anticuerpo de captura anti-IFN- α se adicionaron 100 uL/pozo de citocina recombinante en curva dosis respuesta comenzando en 0.5 ng/mL de rmIFN- α o 100 uL/pozo de sobrenadante a probar, incubando por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó una vez con 400 uL/pozo de solución de lavado, para luego adicionar 100 uL/pozo de anticuerpo biotin-conjugado dejando incubar por 24 horas a 24°C.

Concluido el tiempo de incubación se descartó el medio y lavó tres veces con 400 uL/pozo de solución de lavado, retirando la humedad antes de adicionar 100 uL/pozo de estreptavidina-HRP, cubriendo e incubando 1 hora a 24°C. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó cuatro veces, adicionando 100 uL/pozo de TMB incubando 15 minutos a 24°C y en oscuridad. Finalmente se detuvo la reacción con 100 uL/pozo de solución de paro y leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (Tecan).

Objetivo 4.

Bloqueo de factores.

Para identificar la participación del factor secretado al medio condicionado por estímulo de CasNa, se efectuaron ensayos de bloqueo con anticuerpo neutralizante en cultivos de células 32D estimuladas con CasNa. Brevemente, se cultivaron células 32D a una densidad inicial de 1×10^4 cel/mL en placas de 96 pozos. En todos los casos se consideraron controles positivos de citocina o quimiocina recombinante y anticuerpo mas citocina o quimiocina en dosis necesaria para bloquear la actividad del recombinante incubados por una hora a 37° C de manera previa a la adición al cultivo. Para bloquear la señalización del factor de crecimiento transformante beta, se utilizó el compuesto SB431542, el cual al unirse al receptor I del TGF- β suprime la actividad cinasa.

En todos los casos se evaluó la proliferación a 72 horas de cultivo por la técnica de incorporación de del nucleótido timidina marcado con tritio [β - 3 H]dTTP descrita con anterioridad.

De manera adicional se evaluó en ensayos de bloqueo con anticuerpo neutralizante o inhibidor de la actividad cinasa en cultivos de células 32D estimuladas con CasNa, si existía modulación de la expresión de los antígenos previamente evaluados por citometría de flujo como se describe inicialmente.

Manejo de Datos.

A menos de que se indique otra cosa todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de manera independiente. Los ensayos de proliferación (incorporación de [β - 3 H]-timidina) fueron realizados por cuadruplicado y se presenta el promedio y desviación estándar. Para el ensayo de ELISA, se analizó el medio condicionado de al menos tres ensayos independientes con dos repeticiones por ensayo.

En aquellos donde se indica, se realizó una prueba de Levene para determinar que las varianzas fuesen iguales y posteriormente un análisis de varianza (ANOVA) para la comparación múltiple de medias, empleando la prueba de Dunnet cuando uno de los tratamientos se consideró el control comparando cada una de las otras medias de los tratamientos contra él; o en su caso de Tukey cuando se comparó todos los pares de medias entre sí, en ambos casos $P < 0.05$ respecto al cultivo con solo PBS como vehículo a menos de que se indique otra cosa.

Resultados.

Objetivo 1. Evaluar el efecto del CasNa en la proliferación, viabilidad y diferenciación de la línea celular 32D.

El CasNa bloquea la proliferación de las células 32D sin afectar la viabilidad celular favoreciendo la diferenciación macrofágica.

Para confirmar que el caseinato de sodio regula negativamente la proliferación de la línea celular 32D de ratón, se cultivó en presencia de 0.5 ng/mL de rML-3 con o sin CasNa durante 72 horas. Se encontró que desde 0.5 ng/mL de CasNa se reduce significativamente la proliferación, siendo la dosis de 2 mg/mL la que abate la proliferación de manera cercana al nivel de 1 μ M/mL de 1- β -D-arabinofuranosylcitosina (Ara-C) (Figura 3), la cual suprime la proliferación celular bloqueando la síntesis de DNA (Besirli *et al*, 2003)

Para descartar la posibilidad de que la reducción de la proliferación inducida por CasNa, fuese consecuencia de un efecto tóxico, se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión al azul tripano. Los resultados indican que aún cuando 2 mg/mL reducen contundentemente la proliferación, se mantiene una viabilidad celular superior al 90%, mientras que la Ara-C muestra una viabilidad del 85 % (Tabla 3).

Al evaluar la morfología después de la tinción con Giemsa se encontró que las células 32D en presencia de CasNa se diferencian hacia el linaje monocito-macrófago hasta en un 84% (Figura 4 y Tabla 4). Esta inducción de la diferenciación en presencia de CasNa fue confirmada con tinción citoquímica específica para granulocitos y macrófagos por este mismo grupo de trabajo (Ramos *et al*, 2004).

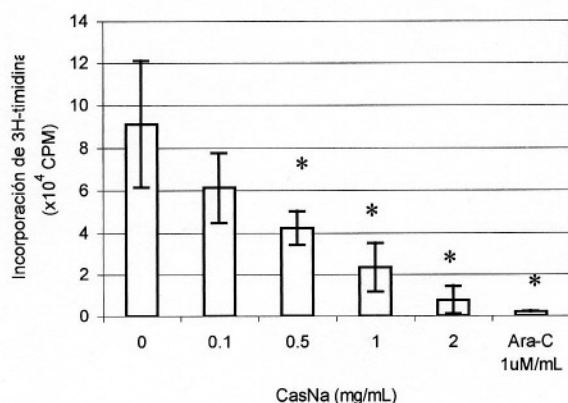


Figura 3. Curva dosis-respuesta de la proliferación de las células 32D después de 72 horas de cultivo en presencia de 0.5 ng/mL de rmIL-3 y diferentes dosis de caseinato de sodio (CasNa) usando como testigo de inhibición 1 uM/mL de 1-β-D-arabinofuranosylcitosina (Ara-C). Evaluación por incorporación de [³H]timidina al DNA. Los datos presentan el promedio y desviación estándar, * la diferencia fue significativa con respecto a 0 ng/ml con una p <0.05 en la prueba de Dunnet.

| Tratamiento | Viabilidad (%) |
|-------------------|----------------|
| PBS | 98 ± 1.1 |
| 2 mg/mL CasNa | 93 ± 9.3 |
| 1 uM/mL Ara-C | 85 ± 11.8 |
| 10 ng/mL rmTNF-α | 98 ± 2.6 |
| 10 ng/mL rmTGF-β1 | 98 ± 0.7 |
| 10 ng/mL rmCCL3 | 98 ± 3.1 |
| 10 ng/mL rmIFN-α | 99 ± 1.0 |

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad de las células 32D después de 48 horas de cultivo en presencia de 0.5 ng/mL de rmIL-3 y 2 mg/mL de caseinato de sodio (CasNa); 1 uM/mL de 1-β-D-arabinofuranosylcitosina (Ara-C); 10 ng/mL de Factor de Necrosis Tumoral alfa recombinante de ratón (rmTNF-α); Factor de Crecimiento Transformante beta 1 recombinante humano (rhTGF-β1); CCL3/MIP-1α recombinante de ratón (rmCCL3); Interferón alfa recombinante de ratón (rmIFN-α) o sólo vehículo (PBS). Evaluación por exclusión al azul tripano

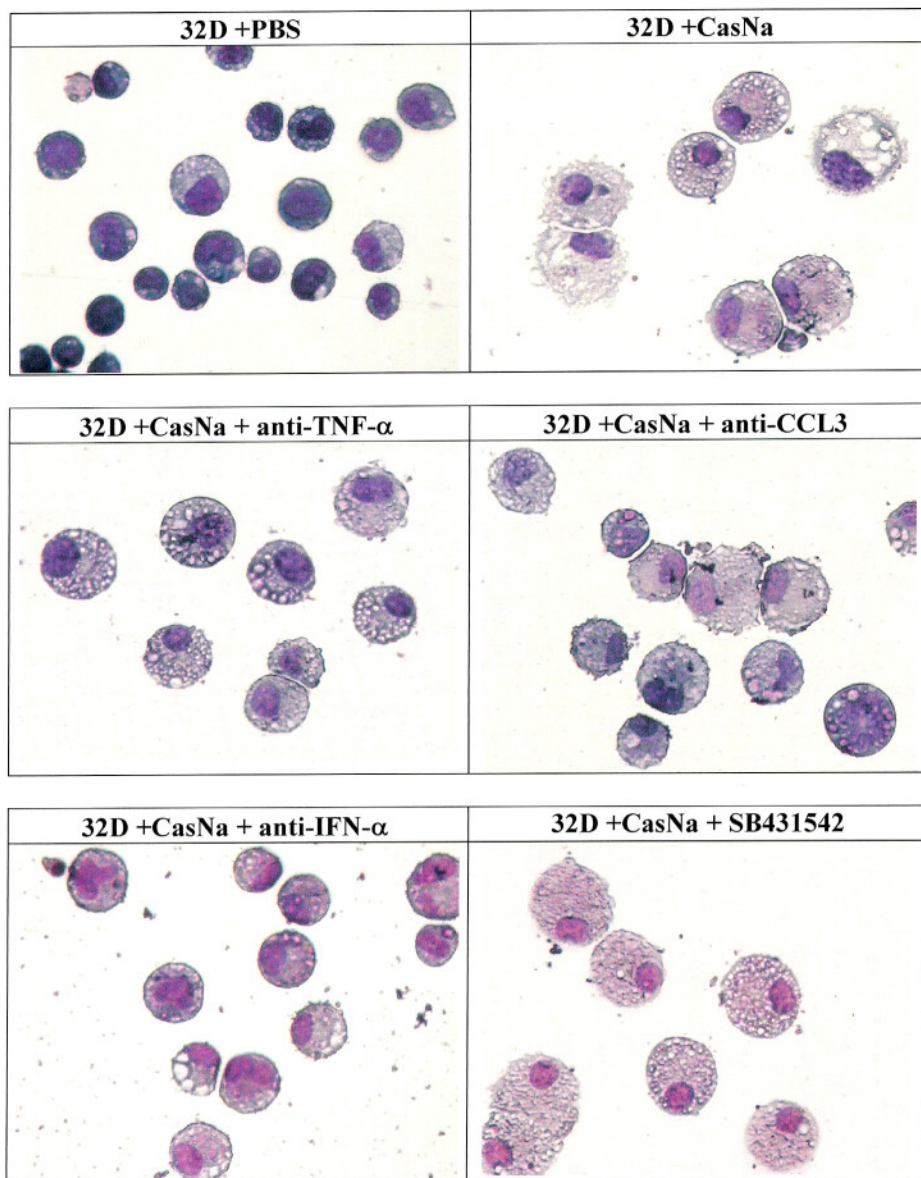


Figura 4. Células 32D cultivadas en presencia de solo vehículo (32D +PBS), 2 mg/mL de CasNa (32D +CasNa) o 2 mg/mL de CasNa mas 16 ug/mL de anticuerpo anti-TNF- α (32D +CasNa +abTNF), 25 ug/mL de anti-CCL3/MIP-1 α (32D +CasNa +abCCL3), 3 ug/mL de anti-IFN- α (32D +CasNa +abIFN) o 0.1 uM/mL de SB431542 (32D +CasNa + SB431542). Evaluación por tinción con Giemsa.

| | Diferenciación Morfológica (%) | |
|--|---------------------------------------|-----------------|
| | granulocito | monocito |
| 32D +PBS | 3.0 ± 2.6 | * 5.0 ± 4.4 |
| 32D +CasNa | 2.0 ± 2.0 | 84.0 ± 11.5 |
| 32D +CasNa + anti-TNF-α | 0.7 ± 1.2 | 83.0 ± 4.0 |
| 32D +CasNa + anti-CCL3 | 0.0 ± 0.0 | 82.0 ± 3.2 |
| 32D +CasNa + anti-IFN-α | 0.7 ± 0.6 | * 33.0 ± 4.0 |
| 32D +CasNa + SB431542 | 0.0 ± 0.0 | 78.0 ± 9.2 |

Tabla 4. Porcentaje de granulocitos y macrófagos obtenidos de células 32D cultivadas en ausencia y presencia de 2 mg/mL de CasNa (32D +PBS y 32D +CasNa respectivamente) o CasNa mas 16 ug/mL de anticuerpo anti-TNF- α (32D +CasNa +abTNF), 25 ug/mL de anti-CCL3/MIP-1 α (32D +CasNa +abCCL3), 3 ug/mL de anti-IFN- α (32D +CasNa +abIFN) y 0.1 uM/mL de SB431542 (32D +CasNa + SB431542). Evaluación por tinción morfológica con Giemsa, los datos presentan el promedio y desviación estándar, (*) la diferencia fue significativa con respecto a 32D + CasNa con una $p < 0.05$ en la prueba de Tukey.

Además de la morfología también se determinó la inducción a la expresión de antígenos específicos del linaje monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo mediante citometría de flujo, por lo que se empleó el anticuerpo anti-fms que reconoce un dominio extracelular del receptor del M-CSF (c-fms, CD115), presente en células del linaje macrófago (Sunderkotter *et al*, 2004) y el anticuerpo anti-Gr-1, el cual reconoce a un dominio de la proteína de membrana Ly-6G, la cual está directamente correlacionada con la diferenciación granulocítica (Tepper *et al*, 1992; Metcalf *et al*, 1997).

Se obtuvo un índice de fluorescencia (IF), dividiendo la intensidad de fluorescencia de las células con anticuerpo específico entre la fluorescencia de las células con el isotipo, así un IF igual a 1 indica que los valores son iguales, un IF de 2 que la fluorescencia de las células con el anticuerpo es el doble a las células con solo isotipo.

Las evaluaciones de las células 32D en presencia de CasNa empleando el anticuerpo anti-fms, muestran un aumento en la intensidad de fluorescencia de los cultivos con tratamiento al compararlos con el cultivo con sólo PBS, así el índice de fluorescencia para el anti-fms es de 3.2 para CasNa (Figura 5).

Cuando se empleó el anticuerpo anti-Gr-1 en las células tratadas también hay un aumento en la fluorescencia siendo el IF de 1.6 con tratamiento de CasNa (Figura 5). El aumento en la fluorescencia en los cultivos con CasNa evidencian un incremento en la diferenciación macrofágica, datos que se correlacionan con lo evaluado en las tinciones morfológicas con Giemsa.

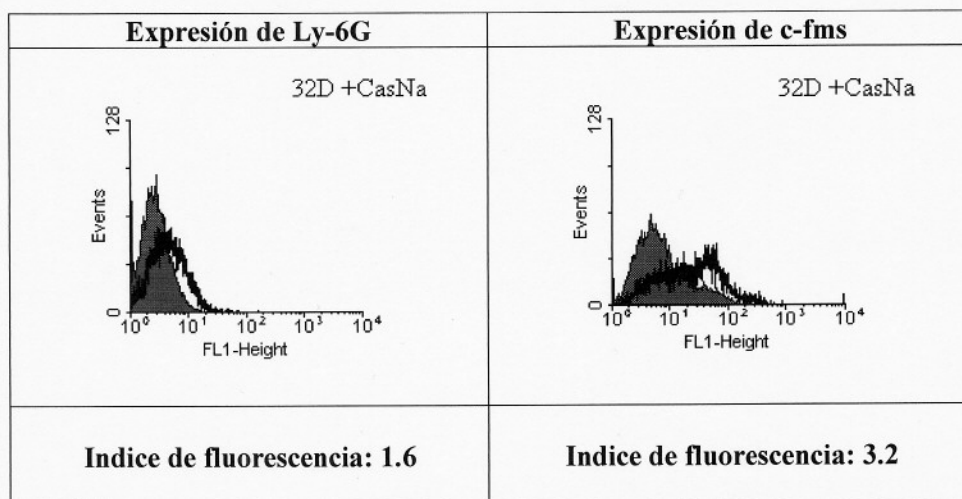


Figura 5. Expresión de Ly-6G y c-fms como marcadores de diferenciación en células 32D después de 72 horas de cultivo en presencia de 0.5 ng/mL de rmlL-3 y 2 mg/mL de CasNa (línea) o solo PBS como vehículo (área sombreada). Evaluación por citometría de flujo empleado el anticuerpo anti-Fms para evaluar la diferenciación macrofágica y el anticuerpo anti-Gr-1 para la diferenciación granulocítica. En el histograma se presenta un ensayo representativo, donde el eje horizontal muestra la intensidad de fluorescencia y el eje vertical el número de eventos. El índice de fluorescencia muestra el cociente de la fluorescencia del tratamiento (2 mg/mL de CasNa) entre la fluorescencia control (sólo PBS como vehículo).

Objetivo 2. Detectar la expresión de mRNA de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en las células 32D tratadas con CasNa.

El CasNa incrementa la expresión de mRNA para TNF- α e IFN- α , pero no CCL3/MIP-1 α o TGF- β 1 en las células 32D.

Se ha mostrado que células hematopoyéticas primitivas expresan de manera constitutiva una amplia variedad de genes (Janowska *et al* 2001), así se evaluó si las células 32D expresaban el mRNA para inhibidores de la proliferación de células hematopoyéticas y si el CasNa inducía su incremento o expresión.

Los análisis de imagen de los productos de RT-PCR (transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa) muestran que las células 32D expresan de manera basal el mRNA para al menos tres citocinas y una quimiocina supresora de la hematopoyesis, mientras que el estímulo de CasNa incrementa la expresión de mRNA para TNF- α e IFN- α (Figura 6A y 6B respectivamente), no así para TGF- β 1 o CCL3/MIP-1 α las cuales mantienen su nivel de expresión basal (Figura 7A y 7B respectivamente).

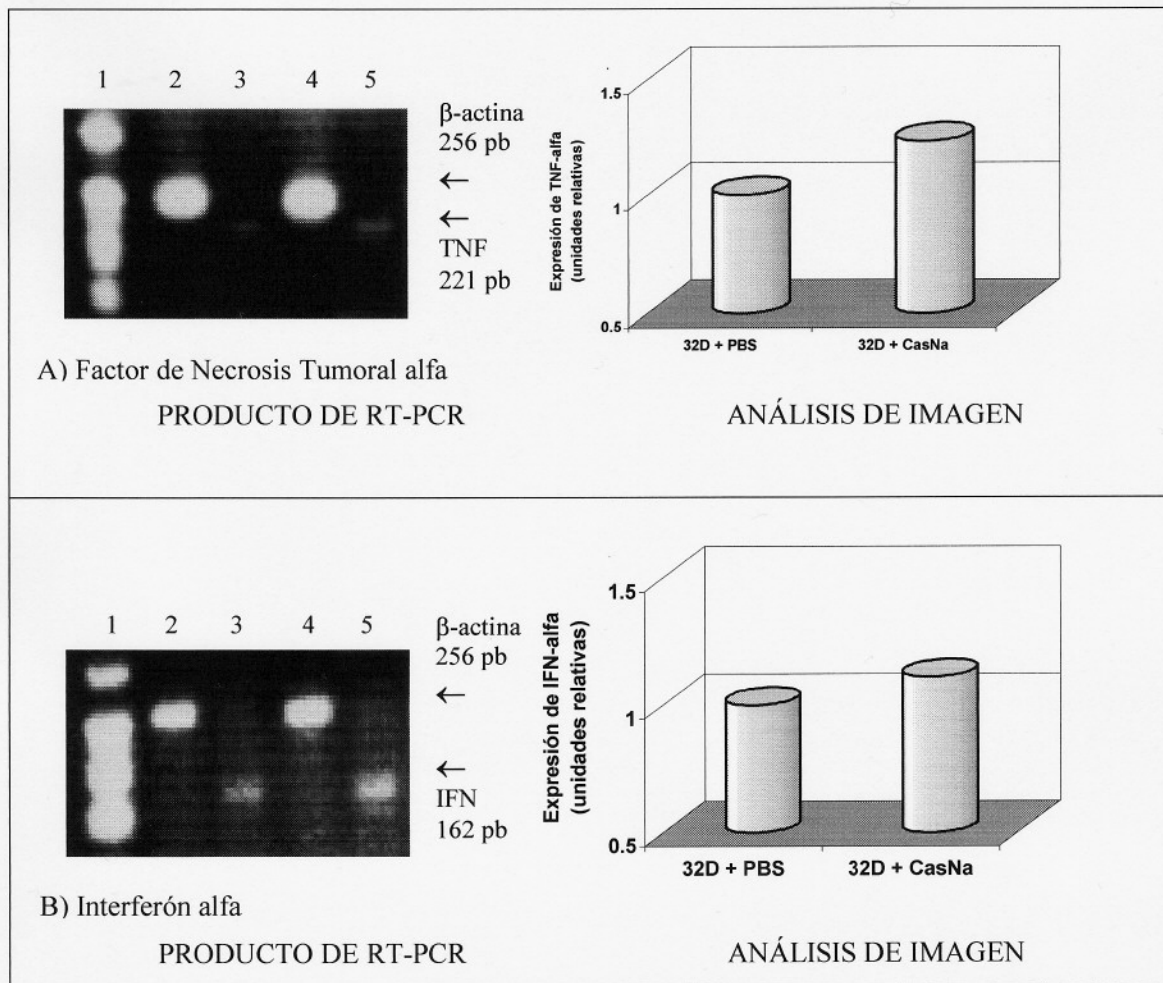


Figura 6. Producto del RT-PCR para (A) TNF- α y (B) IFN- α en células 32D después de 24 horas de cultivo en presencia de 2 mg/ml de CasNa. Carril 1: pesos moleculares; carril 2 y carril 4: β -actina de células 32D cultivadas sin y con CasNa respectivamente; Carril 3 y 5: células 32D cultivadas sin y con CasNa respectivamente. Análisis de imagen. Diferencias en la expresión de mRNA para A) TNF- α y (B) IFN- α . Se comparó la intensidad de expresión de mRNA contra células sin estímulo; la diferencia, es la intensidad de banda del gen con estímulo menos la intensidad de gen sin estímulo, después de homogenizar la intensidad de banda de la β -actina en cada ensayo.

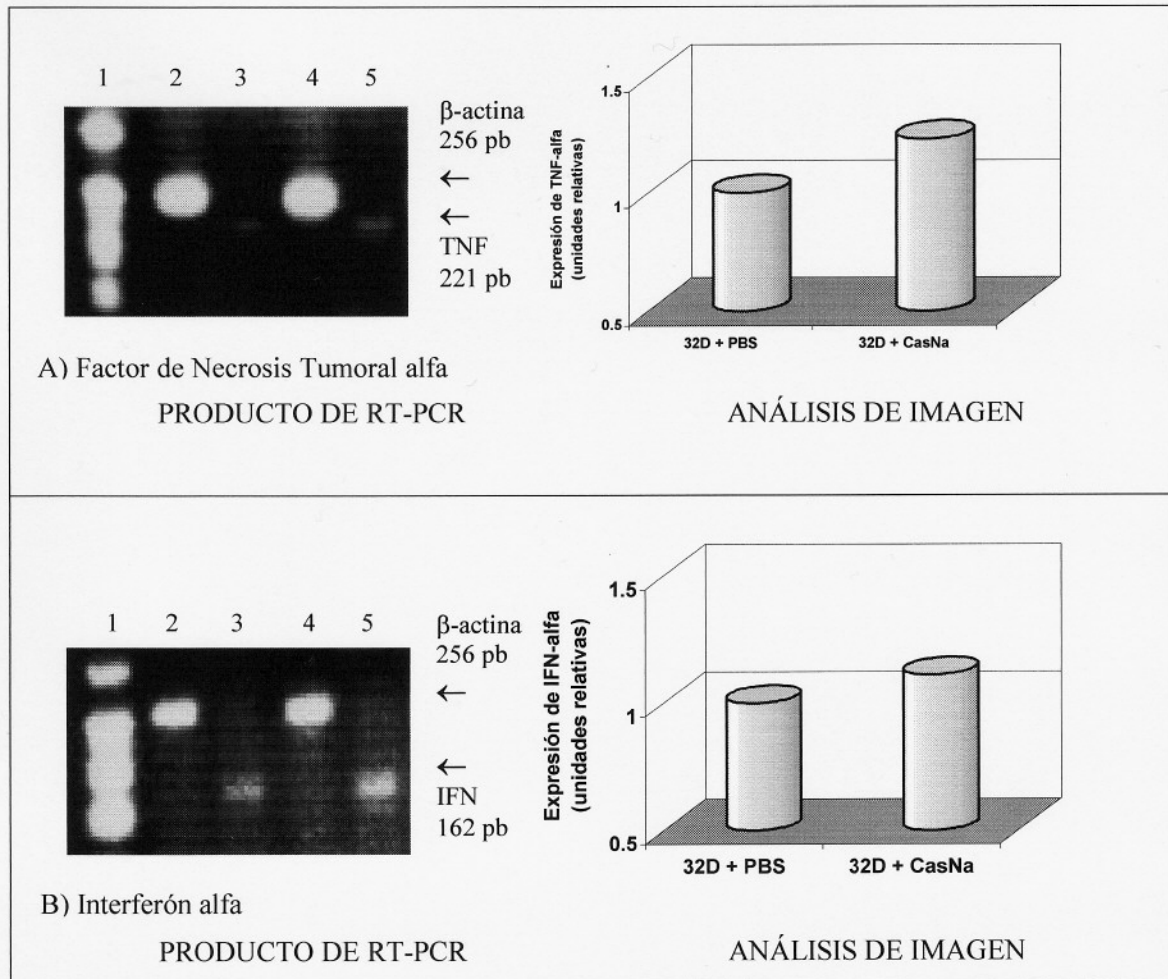


Figura 6. Producto del RT-PCR para (A) TNF- α y (B) IFN- α en células 32D después de 24 horas de cultivo en presencia de 2 mg/ml de CasNa. Carril 1: pesos moleculares; carril 2 y carril 4: β -actina de células 32D cultivadas sin y con CasNa respectivamente; Carril 3 y 5: células 32D cultivadas sin y con CasNa respectivamente. Análisis de imagen. Diferencias en la expresión de mRNA para A) TNF- α y (B) IFN- α . Se comparó la intensidad de expresión de mRNA contra células sin estímulo; la diferencia, es la intensidad de banda del gen con estímulo menos la intensidad de gen sin estímulo, después de homogenizar la intensidad de banda de la β -actina en cada ensayo.

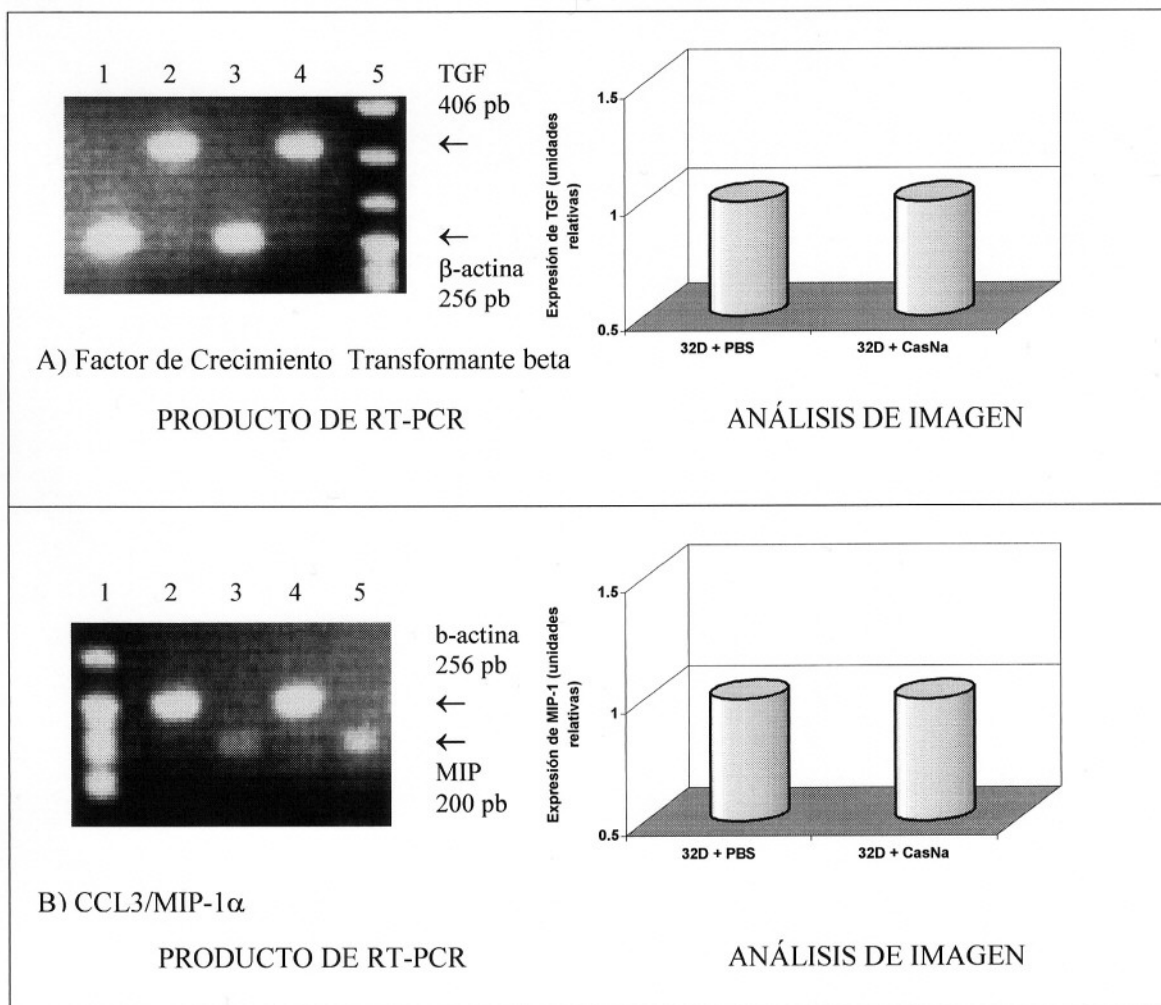


Figura 7. Producto del RT-PCR para (A) TGF- β 1 y (B) CCL3/MIP-1 α en células 32D después de 24 horas de cultivo en presencia de 2 mg/ml de CasNa. (7A) Carril 1 y carril 3: β -actina de células 32D cultivadas sin y con CasNa respectivamente; carril 2 y carril 4: células 32D cultivadas sin y con CasNa respectivamente, Carril 5: pesos moleculares. (7B) Carril 1: pesos moleculares; carril 2 y carril 4: β -actina de células 32D cultivadas sin y con CasNa respectivamente; Carril 3 y 5: células 32D cultivadas sin y con CasNa respectivamente. Diferencias en la expresión de mRNA para A) TGF- β 1 y (B) MIP-1 α . Se comparó la intensidad de expresión de mRNA contra células sin estímulo; la diferencia, es la intensidad de banda del gen con estímulo menos la intensidad de gen sin estímulo, después de homogenizar la intensidad de banda de la β -actina en cada ensayo.

Objetivo 3. Detectar la producción de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en las células 32D estimuladas con CasNa.

El CasNa induce la producción de TNF- α y CCL3/MIP-1 α a la vez que incrementa la de TGF- β en las células 32D.

Al evaluar la presencia de las proteínas TNF- α , TGF- β , CCL3/MIP-1 α e IFN- α en el medio condicionado de células con y sin tratamiento de CasNa, el ensayo de ELISA muestra que 2 mg/mL de CasNa inducen la producción de TNF- α y CCL3/MIP-1 α a 2.19 y 0.83 ng/mL respectivamente (Tabla 5), mientras que incrementa significativamente el nivel basal de TGF- β (0.52 ng/mL, donde la diferencia fue significativa respecto al blanco) hasta 3.47 ng/mL (Tabla 5). Respecto a IFN- α no se encontró diferencia significativa entre medios condicionados de células con y sin tratamiento de CasNa sin embargo, es notable un desplazamiento en la densidad óptica que sugiere la presencia de IFN- α rindiendo una expresión basal de entre 0.03 y 0.04 ng/mL (Tabla 5).

| | ng/mL | | | |
|-----------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------|
| | TNF- α | TGF- β | CCL3/MIP-1 α | IFN- α |
| Blanco | nd | nd | nd | nd |
| mc 32D + PBS | nd | ♣ 0.52 \pm 0.05 | nd | 0.03 \pm 0.01 |
| mc 32D + CasNa | ♠ 2.19 \pm 0.29 | ♠ 3.47 \pm 0.13 | ♠ 0.83 \pm 0.06 | 0.04 \pm 0.01 |

Tabla 5. Ensayo de ELISA para TNF- α , TGF- β , CCL3/MIP-1 α e IFN- α en medio condicionado de células 32D con y sin tratamiento de CasNa (mc32D y mc32D CasNa respectivamente). La absorbancia fue evaluada a 450 nm. Los datos presentan el promedio y desviación estándar, (♣) la diferencia fue significativa con respecto al blanco (nd) y (♠) con respecto a MC 32D + PBS con una $p < 0.05$ en la prueba de Tukey.

Objetivo 4. Evaluar la participación de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en el abatimiento de la proliferación celular de 32D.

El rmTNF- α , rhTGF- β 1 y rmIFN- α pero no el rmCCL3/MIP-1 α reducen la proliferación de 32D sin afectar la viabilidad celular.

Considerando que el TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α son reconocidos inhibidores de la hematopoyesis y por tanto candidatos a mediar el bloqueo inducido por el CasNa, se evaluó si las proteínas recombinantes de estos factores bloqueaban la proliferación de las células 32D en presencia de 0.5 ng/mL de IL-3.

Los resultados indican que los recombinantes de TNF- α , TGF- β 1 e IFN- α suprimen significativamente la proliferación desde 1 ng/mL (Figura 8A, 8B y 8C), mientras que en las mismas condiciones de cultivo ninguna de las concentraciones del recombinante de CCL3/MIP-1 α modificaron la proliferación celular (Figura 8D) aún incrementando la dosis de recombinante hasta 500 ng/mL (Figura 9).

Por otro lado y de manera análoga al CasNa, las células tratadas con y sin las proteínas recombinantes, en todos los casos mantienen una viabilidad superior al 90% independientemente de la dosis empleada a 48 horas de estímulo en evaluación por exclusión al azul tripano (Tabla 3).

Es interesante señalar que no obstante que el recombinante de CCL3/MIP-1 α no tuvo efecto sobre la proliferación celular, la proteína recombinante es biológicamente activa, como lo evidencia el ensayo biológico de quimiotaxis sobre células totales de bazo de ratón donde 10 ng/mL de proteína recombinante de CCL3/MIP-1 α inducen migración celular, quimiotaxis que es neutralizada con 25 ug/mL de anticuerpo anti-CCL3/MIP-1 α (Figura 10).

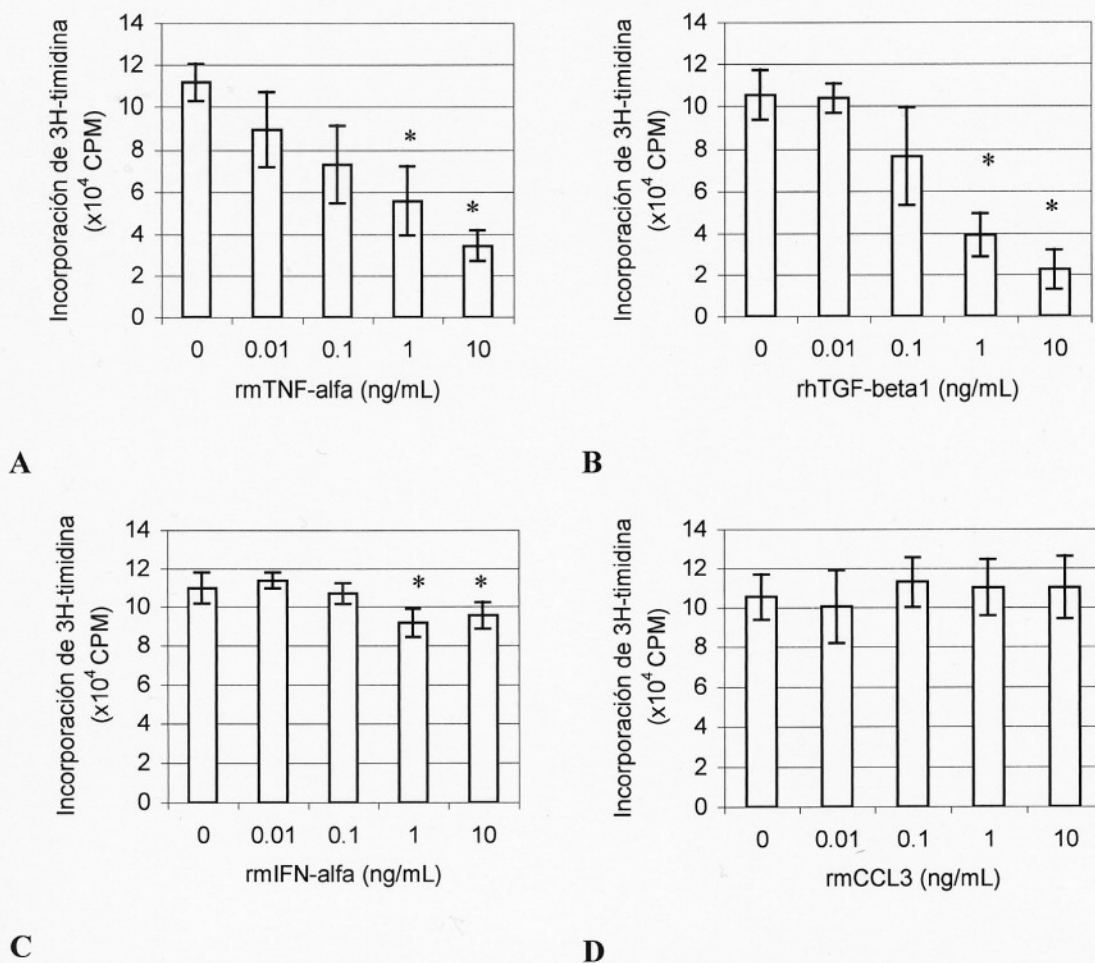


Figura 8. Curvas dosis-respuesta de la proliferación de 32D después de 48 horas de cultivo en presencia de 0.5 ng/mL de rmIL-3 y diferentes dosis de A) Factor de Necrosis Tumoral alfa recombinante de ratón (rmTNF- α), B) Factor de Crecimiento Transformante beta 1 recombinante humano (rhTGF- β 1), C) Interferón alfa recombinante de ratón (rmIFN- α) y D) CCL3/MIP-1 α recombinante de ratón (rmCCL3). Evaluación por incorporación de [³H]timidina al DNA. Los datos presentan el promedio y desviación estándar, * la diferencia fue significativa con respecto a 0 ng/ml con una $p < 0.05$ en la prueba de Dunnet.

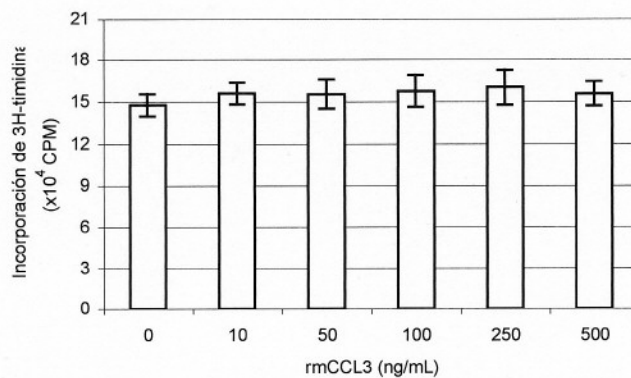


Figura 9) Curva dosis-respuesta de la proliferación de 32D después de 48 horas de cultivo en presencia de 0.5 ng/mL de rml-3 y diferentes dosis de CCL3/MIP-1 α recombinante de ratón (rmCCL3). Evaluación por incorporación de [³H]timidina al DNA. Los datos presentan el promedio y desviación estándar.

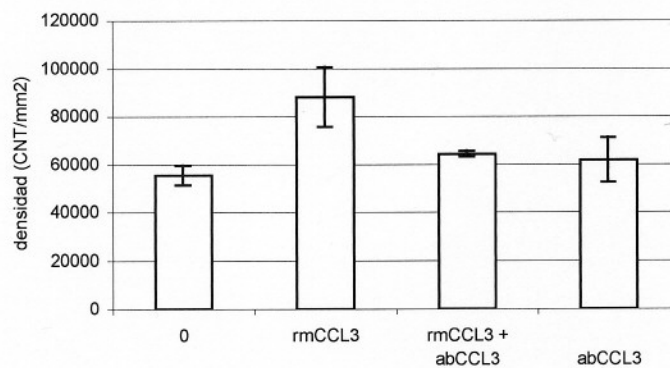


Figura 10. Quimiotaxis de células totales de bazo de ratón en ausencia o presencia de 10 ng/mL de CCL3/MIP-1 α recombinante de ratón (rmCCL3) y de 25 ug/mL de anticuerpo anti-CCL3/MIP-1 α (abCCL3). Los datos presentan el promedio y desviación estándar de la densidad de fluorescencia medida en el FX en CNT/mm².

El bloqueo de la proliferación de las células 32D tratadas con CasNa, es parcialmente mediado por el TNF- α .

Se estimuló a las células 32D con 2 mg/mL de CasNa adicionando el anticuerpo dirigido contra TNF- α , CCL3/MIP-1 α , IFN- α y el inhibidor SB431542 contra la actividad cinasa del TGF β RI de manera individual en dosis suficiente para en su caso, bloquear la actividad inhibitoria de la citocina recombinante y los resultados muestran que 16 ug/mL de anti-TNF- α neutraliza de manera parcial el efecto antiproliferativo del CasNa (Figura 11A). Dosis de hasta 25 ug/mL de anticuerpo anti-TNF- α no contrarresta el efecto inhibitorio mas allá de la dosis inicial de 16 ug/mL (datos no mostrados).

Por su parte los anticuerpos anti-CCL3/MIP-1 α , anti-IFN- α y el inhibidor SB431542 de la actividad cinasa del TGF β RI no neutralizaron el efecto inhibitorio de CasNa (Figura 11B, 11C y 11D respectivamente), aún incrementando la concentración de anticuerpo (datos no mostrados).

Por otro lado, mientras que la adición de anticuerpo anti-TNF- α neutralizó parcialmente el efecto antiproliferativo de CasNa, no parece frenar la inducción de diferenciación (Figura 4 y Tabla 6). De manera análoga, el anticuerpo anti-CCL3/MIP-1 α y el inhibidor SB431542 no modificaron de manera sustancial los porcentajes de diferenciación en cultivos con CasNa, solo la adición de anti-IFN- α redujo significativamente la diferenciación hacia macrófagos (Figura 4 y Tabla 6).

Para corroborar la aparente no neutralización de la acción diferenciadora del CasNa por parte de los anticuerpos (a excepción del anti-IFN- α), se analizó por citometría de flujo la expresión de los antígenos de superficie previamente evaluados en cultivos con solo CasNa o PBS como vehículo y los resultados muestran que la adición de anticuerpos no neutraliza el incremento en la expresión de c-fms promovido por el CasNa (Figura 13, Figura 14 y Tabla 6).

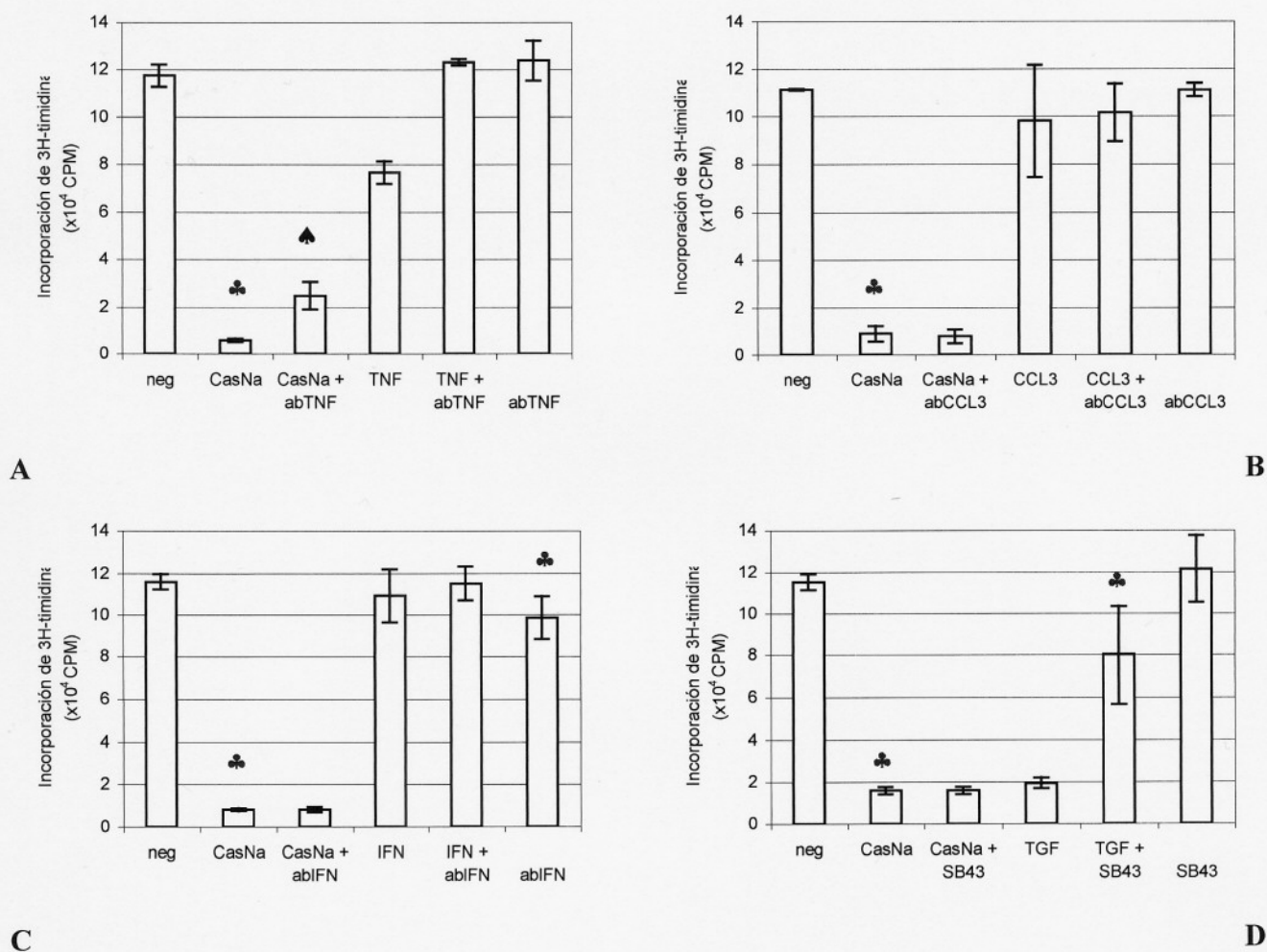


Figura 11. Proliferación de 32D después de 72 horas de cultivo en presencia de 0.5 ng/mL de rmlL-3 sin y con 2 mg/mL de CasNa (neg y CasNa respectivamente) mas A) 16 ug/mL de anticuerpo antiTNF- α (abTNF) sin y con 10 ng/mL de rmTNF- α usado como testigo positivo (TNF); B) 25 ug/mL de anticuerpo anti-CCL3/MIP-1 α (abCCL3) sin y con 10 ng/mL de rmCCL3/MIP-1 α usado como testigo positivo (CCL3); C) 3 ug/mL de anticuerpo antiIFN- α (abIFN) sin y con 10 ng/mL de rmIFN- α (IFN) usado como testigo positivo, D) 0.1 uM/mL de SB431542 (SB43) sin y con 10 ng/mL de rhTGF- β usado como testigo positivo (TGF). Incorporación de [³H]timidina al DNA. Los datos presentan el promedio y desviación estándar, (♣) la diferencia fue significativa con respecto al negativo (solo rmlL-3) y con respecto a CasNa (♠) con una p<0.05 en la prueba Tukey.

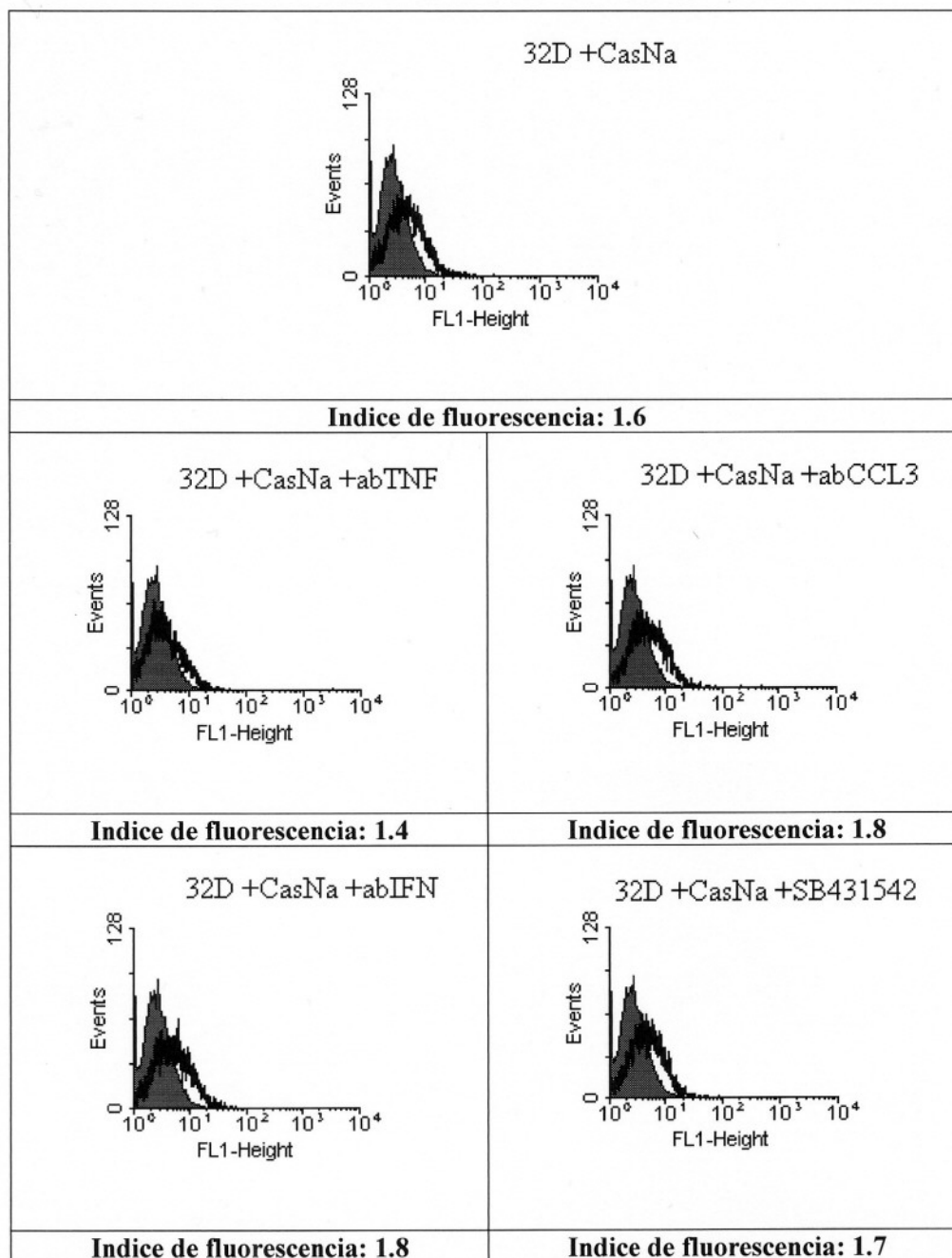


Figura 12. Expresión de Ly-6G como marcador de diferenciación granulocítica en células 32D después de 72 horas de cultivo en presencia de 0.5 ng/mL de rmIL-3 y solo PBS (área sombreada) o 2 mg/mL de CasNa (línea), 2 mg/ml de CasNa mas 16 ug/mL de anticuerpo anti-TNF- α (32D +CasNa +abTNF), 25 ug/mL de anti-CCL3/MIP-1 α (32D +CasNa +abCCL3), 3 ug/mL de anti-IFN- α (32D +CasNa +abIFN) y 0.1 uM/mL de SB431542 (32D +CasNa + SB431542). A menos que se indique lo contrario, el area sombreada representa las células en presencia de solo PBS y la línea las células en presencia de CasNa mas anticuerpo específico.

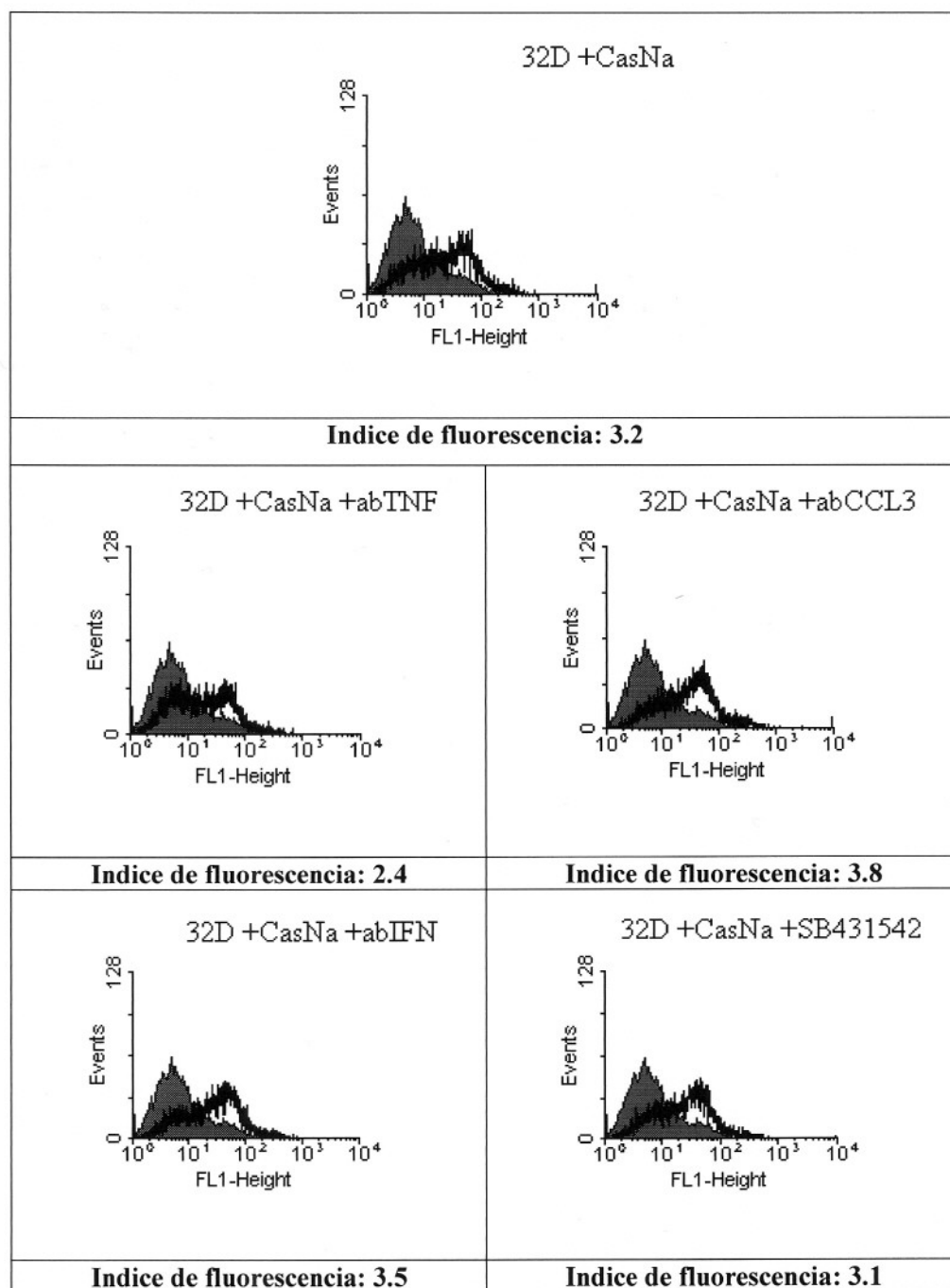


Figura 13. Expresión de c-fms como marcador de diferenciación macrofágica en células 32D después de 72 horas de cultivo en presencia de 0.5 ng/mL de rmIL-3 y solo PBS (área sombreada) o 2 mg/mL de CasNa (línea), 2 mg/ml de CasNa mas 16 ug/mL de anticuerpo anti-TNF- α (32D +CasNa +abTNF), 25 ug/mL de anti-CCL3/MIP-1 α (32D +CasNa +abCCL3), 3 ug/mL de anti-IFN- α (32D +CasNa +abIFN) y 0.1 uM/mL de SB431542 (32D +CasNa + SB431542). A menos que se indique lo contrario, el area sombreada representa las células en presencia de solo PBS y la línea las células en presencia de CasNa mas anticuerpo específico.

| | Indice de Fluorescencia | |
|--|--------------------------------|---------------------------|
| | Ly-6G granulocito | c-fms monocito |
| 32D +PBS | 1.1 | 1.4 |
| 32D +CasNa | 1.6 | 3.2 |
| 32D +CasNa + anti-TNF-α | 1.4 | 2.4 |
| 32D +CasNa + anti-CCL3 | 1.8 | 3.8 |
| 32D +CasNa + anti-IFN-α | 1.8 | 3.5 |
| 32D +CasNa + SB431542 | 1.7 | 3.1 |

Tabla 6. Índice de fluorescencia en la expresión de Ly-6G y c-fms como marcadores de diferenciación en células 32D después de 72 horas de cultivo en presencia de 0.5 ng/mL de rmlL-3 y 2 mg/mL de CasNa (32D +CasNa), 2 mg/ml de CasNa mas 16 ug/mL de anticuerpo anti-TNF- α (32D +CasNa +abTNF), 25 ug/mL de anti-CCL3/MIP-1 α (32D +CasNa +abCCL3), 3 ug/mL de anti-IFN- α (32D +CasNa +abIFN) y 0.1 uM/mL de SB431542 (32D +CasNa + SB431542). El índice de fluorescencia muestra el cociente de la fluorescencia del tratamiento entre la fluorescencia control (células con solo PBS).

Discusión de resultados.

Objetivo 1. Evaluar el efecto del CasNa en la proliferación, viabilidad y diferenciación de la línea celular 32D.

En este trabajo se muestra que el caseinato de sodio inhibe la proliferación de las células 32D a pesar de la presencia de 0.5 ng/mL de rmIL-3 (Figura 3), freno que no es consecuencia de pérdida en la viabilidad celular (Figura 4), resultados que concuerdan ampliamente con lo previamente reportado por este grupo de trabajo (Ramos *et al*, 2004; Ramos *et al*, 2000). En el mismo orden de ideas, se confirmó por tinción con Giemsa y expresión de antígenos de superficie evaluados por citometría de flujo, la capacidad del CasNa para inducir un fuerte incremento en la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago (Tabla 4 y Tabla 6).

Estos elementos, aunados a la evidencia de que la caseína y el propio CasNa ejercen un efecto quimiotáctico para células granulocíticas y monocíticas al sitio de infección (propiedad proinflamatoria) (Pasotti *et al*, 1993) y que la β -caseína coestimula la proliferación de linfocitos T y B (Kawahara *et al*, 2004) pero que la κ -caseína lo bloquea (Otani & Hata 1995), indican que las caseínas tienen la capacidad de modular la proliferación, diferenciación y activación de células mieloides y linfoides y que es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que conducen a tal modulación.

En este sentido, este grupo de trabajo ha mostrado que la inducción a la diferenciación macrofágica de la línea celular 32D, en presencia de CasNa, va acompañada de la inducción a la expresión del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), y que además este factor es bioactivo (Ramos, *et al*, 2004). Sin embargo la participación de este factor en la diferenciación mediada por el CasNa no se conoce como tampoco si en la inhibición de la proliferación e inducción de diferenciación celular están involucradas citocinas inhibitorias de la hematopoyesis.

Objetivo 2. Detectar la expresión de mRNA de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en las células 32D tratadas con CasNa.

Es conocido que el microambiente de la médula ósea está bajo la regulación no solo de factores de crecimiento, sino también de citocinas y/o quimiocinas que suprimen la hematopoyesis y que algunos de éstos factores (TNF- α , TGF- β 1 y CCL3/MIP-1 α) se encuentran de manera constitutiva en aspirados de médula ósea cuando menos a nivel de mRNA (Cluitmans *et al*, 1995). Sin embargo, la identidad de las células encargadas de secretar estos factores se había atribuido a las células del estroma de la médula ósea dado que fibroblastos, macrófagos y células endoteliales son los tipos celulares que de manera típica secretan estas citocinas (Cheng *et al*, 2003). Es hasta el 2001 que el grupo de Ratajczak dio la primera evidencia de que las células primitivas de la médula ósea humana expresaban el mRNA para una gran cantidad citocinas y quimiocinas incluyendo supresores de la hematopoyesis e incluso que secretaban algunas de ellas como TGF- β 1 y CCL3/MIP-1 α (Majka *et al*, 2001). De esta manera se consideró que la línea celular 32D aún siendo primitiva podían expresar el mRNA para citocinas supresoras de la hematopoyesis de tal suerte que al ser estimuladas con CasNa, podía favorecerse la traducción y en consecuencia las proteínas secretadas ser las responsables del efecto inhibitorio de la proliferación inducido por CasNa.

Los resultados confirman el supuesto de que la línea celular 32D, un modelo de hematopoyesis primitiva normal de ratón de manera análoga a las células primitivas humanas, expresan de manera basal genes de citocinas y quimiocinas supresoras de la hematopoyesis y cuyo nivel de expresión puede incrementarse por estímulo de CasNa desde las 24 horas (TNF- α , IFN- α) o permanecer sin alteración (TGF- β 1 y CCL3/MIP-1 α) (Figura 6 y Figura 7 respectivamente). En este sentido, dado que existe expresión basal de mRNA, es difícil identificar de modo cualitativo (visualización del producto de RT-PCR) la diferencia de expresión entre células con y sin tratamiento de CasNa, si bien el análisis de imagen de los productos de RT-PCR permitió identificar diferencias en cuanto a la expresión de TNF- α e IFN- α no fue así para TGF- β 1 y CCL3/MIP-1 α , es posible que el empleo de una metodología cuantitativa por ejemplo RT-PCR en tiempo real, permita esclarecer si el mRNA para TGF- β 1 y CCL3/MIP-1 α son modulados por CasNa o no.

Objetivo 3. Detectar la producción de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en las células 32D estimuladas con CasNa.

Hasta el momento ha sido posible detectar que el CasNa induce la producción de TNF- α y CCL3/MIP-1 α mientras que incrementa la expresión de TGF- β 1 y no parece modular al IFN- α (Tabla 5).

La expresión constitutiva de TGF- β 1 (0.52 ng/mL) en las células hematoyéticas primitivas 32D concuerda con la detección de esta misma citocina (1.10 ng/mL) en el sobrenadante de células primitivas CD34+ de médula ósea humana (Majka *et al*, 2001). En este sentido, no es extraño que TGF- β 1 se haya detectado de manera basal, existen reportes en los que el empleo de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra TGF- β 1 secretado constitutivamente por parte de las células CD34+ derivadas de cordón umbilical, incrementan la formación de colonias (Cardoso *et al*, 1993), así la neutralización del TGF- β 1 basal con anti-TGF- β 1 permite a las células primitivas una continua proliferación bajo condiciones en las que deberían permanecer en quiescencia (Cashman *et al*, 1998), en nuestro modelo se consideró que el TGF- β 1 al encontrarse de manera basal podía actuar como un control interno/constitutivo de la proliferación o incluso en el mantenimiento de la viabilidad celular de 32D, siendo el estímulo externo (CasNa) quien al perturbar el balance conducía a la supresión de la proliferación. La aparente no modulación a nivel de mRNA (Figura 7A), pero el significativo incremento en la expresión de proteína de hasta siete veces en relación al control (Tabla 5), sugiere que para el caso de TGF- β 1 el tratamiento de CasNa favorece la traducción del mRNA para esta citocina.

Por otro lado y de manera análoga a las células CD34+ humanas, las células 32D de ratón expresan de manera constitutiva el mRNA para TNF- α , citocina que no fue detectada a nivel de proteína como ocurre en las células primitivas humanas (Majka *et al*, 2001). Solamente en presencia de CasNa se induce la producción de la proteína hecho que se correlaciona con la modulación positiva de la expresión basal del gen (Figura 7A).

Por otro lado, el mRNA basal detectado para CCL3/MIP-1 α en la línea 32D no parece ser traducido a proteína de manera constitutiva como si ocurre en células primitivas humanas CD34+ de médula ósea, en las que se ha podido detectar hasta 2 ng/mL de CCL3/MIP-1 α (Majka *et al*, 2001). En este sentido y tomando como base que las células CD34+ secretan de manera constitutiva diferentes quimiocinas (CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CXCL4/PF-4, CXCL8/IL-8 y CCL2/MCP-1)

(Majka *et al*, 2001), se ha sugerido que la síntesis de éstas moléculas responde a la necesidad de interacción entre las células hematopoyéticas primitivas y las células del estroma dentro del microambiente de la médula ósea, para favorecer la angiogénesis o regular la migración y adhesión celular (Janowska *et al*, 2001). Considerando que las células 32D provienen de una línea celular dependiente de IL-3 sin comunicación con células estromales, puede explicar la ausencia de expresión basal de CCL3/MIP-1 α , pero la adición de CasNa al inducir diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago es posible que éstas células maduras sean las responsables de la secreción de CCL3/MIP-1 α , tomando como base que es un factor secretado por macrófagos (Menten *et al*, 2002), en particular en el microambiente de la médula ósea en respuesta a diversos estímulos incluyendo IL-1 β y TNF- α (Taichman *et al*, 2000), de esta manera el perfil de expresión de quimiocinas en las células 32D con tratamiento de CasNa merece mayor atención y así ampliar el conocimiento de su participación en la regulación hematopoyética mediada por el CasNa.

A diferencia de las células CD34+ humanas que expresan de manera basal mRNA para IFN- α pero no parecen secretar la citocina de modo constitutivo (Majka *et al*, 2001), los resultados sugieren que las células 32D expresan y secretan IFN- α al medio condicionado aún en condiciones basales (Tabla 5), síntesis que no parece ser modulada por el tratamiento de CasNa dado que no se encontró diferencia entre cultivos con y sin CasNa, lo cual contrasta con el patrón observado para las citocinas analizadas con anterioridad (TNF- α , TGF- β 1 y CCL3/MIP-1 α).

Objetivo 4. Evaluar la participación de TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α e IFN- α en el abatimiento de la proliferación celular de 32D.

Se evidenció la participación de TNF- α en el abatimiento de la proliferación de 32D cultivada con CasNa, aunque su intervención es parcial dado que la presencia del anticuerpo anti-TNF- α , neutraliza solo de manera marginal la inhibición de la proliferación inducida por CasNa (Figura 11A) aún incrementando la dosis hasta 25 μ g/mL (datos no mostrados). Es interesante señalar que a pesar de que la supresión hematopoyética inducida por TNF- α generalmente se asocia a pérdida en la viabilidad celular, cultivos de 32D con tratamiento de CasNa o TNF- α recombinante no muestran alteración de este parámetro (Tabla 3). Este hecho refuerza el efecto dual que se ha reportado para ésta citocina, toda vez que es capaz de arrestar el ciclo celular de manera reversible (Eaves *et al*, 1993a), actuar como promotor de la sobrevivencia, ejercer un importante papel como radioprotector sobre células mieloides (Karkanitsa *et al*, 1997; Dalmau *et al*, 1997), incrementando la sobrevivencia *in vitro*, elevando el número de células viables y suprimiendo apoptosis por sí misma (Jacobsen *et al*, 1996) o bien en sinergia con una o más citocinas (Neta *et al*, 1988; Jacobsen *et al*, 1996).

A pesar de la neutralización parcial de la supresión de la proliferación, la adición de anticuerpo anti-TNF- α no frena de manera significativa la inducción de diferenciación (Tabla 4). Estos elementos sugieren que TNF- α tiene poca relevancia en la inducción de diferenciación; lo cual contrasta con reportes en los que se señala que TNF- α es un potente inductor de diferenciación hacia monocitos por ejemplo, en las células tumorales U937 humanas (Hashimoto & Hanazawa 1990), de leucemia mielomonocítica WEHI 3B de ratón y de leucemia humana KG-1a (Leung *et al*, 1994; Mak *et al*, 1993). En la misma línea, considerando que TNF- α induce la expresión del gen de M-CSF (Kharbanda *et al*, 1990) mientras que promueve la secreción de M-CSF en monocitos humanos (Oster *et al*, 1987), y tanto M-CSF como su receptor (c-fms) son modulados por CasNa, se consideró factible que el TNF- α fuese el responsable directo de la expresión de c-fms o incluso de la síntesis de M-CSF (Ramos *et al*, 2004), sin embargo como muestran las evaluaciones por citometría de flujo, la adición de anticuerpo anti-TNF- α solo disminuye parcialmente la expresión de c-fms (IF de 2.4 en células con anti-TNF- α contra 3.2 con solo CasNa) (Tabla 6) y no se alcanzan los niveles encontrados en células con solo PBS (IF de 1.4), así, estos elementos sugieren que el TNF- α no está vinculado de manera estrecha con la inducción de diferenciación macrofágica promovida por CasNa.

A diferencia de la neutralización de la inhibición de la proliferación lograda con anticuerpo anti-TNF- α , la neutralización de CCL3/MIP-1 α en cultivos con CasNa no modificó tal supresión. La aparente no intervención de la quimiocina en el mecanismo inhibitorio de CasNa coincide con la respuesta de las células 32D frente al recombinante de CCL3/MIP-1 α quien no tuvo efecto significativo sobre la proliferación (Figura 8D), a pesar de ser biológicamente activo (Figura 10). El hecho de que CCL3/MIP-1 α no inhibiera la proliferación de las células 32D concuerda con el hecho de que, si bien esta quimiocina suprime la proliferación de células progenitoras particularmente *in vivo* (Dunlop *et al*, 1992; Maze *et al*, 1992; Graham *et al*, 1990) *in vitro*, su capacidad como inhibidor puede ir de eficiente (Broxmeyer *et al*, 1993; Eaves *et al*, 1993b) a moderada (Lu *et al*, 1993) y mínima (Ranst *et al*, 1996; Keller *et al*, 1994; Schneider & Moore 1991) o incluso puede estimular la proliferación (Wynter *et al*, 1998; Broxmeyer *et al*, 1990).

Por ejemplo se ha observado *in vitro* una mínima respuesta hacia CCL3/MIP-1 α por parte de células CD34+ de médula ósea humana, ya que se inhibe la proliferación de manera contundente solo con una concentración muy por encima (500 ng/mL) de los niveles reportados como fisiológicamente relevantes para ésta quimiocina (<100 ng/mL) (Menten *et al*, 2002; Flesh *et al*, 1998), mientras que células CD34+ obtenidas de cordón umbilical lejos de ser suprimidas por CCL3/MIP-1 α se advierte un incremento en la proliferación y subsecuente obtención de células formadoras de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CFC) (Wynter *et al*, 1998). En este sentido, se ha sugerido que la respuesta diferencial que muestran las células ante el CCL3/MIP-1 α , puede estar relacionada con la proporción de receptores en la célula (Schneider & Moore 1991; Verfaillie *et al*, 1994; Lu *et al*, 1993). Sería interesante explorar si las células 32D expresan de manera constitutiva receptores para CCL3/MIP-1 α o incluso, considerando la inducción de la quimiocina en las células tratadas con CasNa si éste último tiene la capacidad para modular la expresión de CCR1 y CCR5. Considerando que células CD34+ de médula ósea son inhibidas de manera mínima por CCL3/MIP-1 α y éstas expresan el receptor CCR1 pero no CCR5 (Wynter *et al*, 1998) y se ha mostrado que CCR1 no parece estar involucrado en la inhibición de la proliferación de células stem hematopoyéticas (Graham *et al*, 1996), es posible que las células 32D tengan un perfil de expresión CCR1/CCR5 similar a las CD34+.

Por otro lado, se ha sugerido que CCL3/MIP-1 α es necesario para la liberación de TNF- α por parte de ratones inmunizados y retados con OVA, así se ha observado que a diferencia de ratones silvestres (+/+), los deletados para el gen de CCL3/MIP-1 α (-/-) no secretan TNF- α a exudados peritoneales (Ramos *et al*, 2005), sin embargo en el modelo de células 32D la neutralización de

CCL3/MIP-1 α en cultivos con CasNa no revirtió la supresión hematopoyética, haciendo poco probable que CCL3/MIP-1 α este asociado a la modulación de expresión de TNF- α . De manera análoga a la adición de anticuerpo anti-TNF- α , las células con CasNa y anticuerpo anti-CCL3/MIP-1 α conservan características de diferenciación similares a las registradas en cultivos con solo CasNa (Figura 4 y Tabla 6), de esta manera tanto CCL3/MIP-1 α como TNF- α no parecen estar implicados en la inducción de diferenciación instigada por CasNa.

En cuanto a IFN- α , la adición de anticuerpo anti-IFN- α a cultivos con CasNa no neutraliza la inhibición de la proliferación (Figura 11C), lo cual sugiere que ésta citocina al igual que CCL3/MIP-1 α , tampoco participa en la supresión de la proliferación celular. Este hecho ajusta con la respuesta de las células 32D ante el recombinante de IFN- α , donde el rango de 0.01 a 0.1 ng/mL que comprende la cantidad de citocina que los resultados de ELISA sugieren existe en el medio (0.04 ng/mL Tabla 5) no afecta la proliferación celular, siendo únicamente 1 ng/mL de recombinante la concentración que consiguió abatir la proliferación de manera significativa (Figura 8C). Esto contrasta con lo reportado en un estudio donde se muestra que el IFN- α suprime de manera eficiente la proliferación de las células 32D (Russo *et al.*, 1999). Así y no obstante que la proteína secretada al medio por estímulo de CasNa parecen no tener mayor relevancia en el bloqueo de la proliferación celular (Figura 11C) y el recombinante solo en dosis de 1 ng/mL suprime la proliferación pero de manera marginal (Figura 8C), es interesante señalar que la adición de anti-IFN- α a cultivos con CasNa, frena de manera significativa la diferenciación morfológica sin embargo, la expresión del antígeno de superficie c-fms característico del linaje macrofágico y que es inducido por CasNa, no es neutralizada en cultivos con anticuerpo anti-IFN- α (Tabla 6), lo cual parece apoyar el supuesto de que el IFN- α aunque podría estar involucrado en la promoción de características morfológicas del linaje monocítico en el contexto de cultivos con tratamiento de CasNa, no parece ser el responsable integral de la diferenciación.

Por otro lado, la neutralización de la actividad cinasa del receptor I para TGF- β en cultivos con CasNa si bien no neutralizó la inhibición de la proliferación (Figura 11D), las evaluaciones morfológicas con Giemsa muestran que se acentúan las características macrofágicas como son la disminución del tamaño del núcleo, aparición de vacuolas y prolongación de la membrana plasmática típicas del linaje monocito-macrófago (Figura 4), sin embargo, no fue modulada la expresión de antígenos de superficie aquí evaluados no encontrándose diferencia entre la expresión entre cultivos con CasNa y SB431542 y con solo CasNa (Tabla 6). De esta manera la inducción de diferenciación que se observa en cultivos con CasNa queda lejos de ser responsabilidad de TGF- β ,

a pesar de que se ha reportado que esta citocina promueve la diferenciación hacia el linaje macrofágico sin embargo, es pertinente señalar que al igual que a lo reportado con TNF- α se trata de modelos leucémicos humanos (U937, THP-1 y ML-1) (Kamijo *et al*, 1990), que no necesariamente reflejan el contexto, características y potencial respuesta de una línea hematopoyética considerada como normal en un modelo de ratón como es la línea celular 32D.

Los datos aquí mostrados sugieren que la señal que en lo fundamental suprime la proliferación y dirige las células hacia el linaje monocito-macrófago, no está en las citocinas y/o quimiocina inhibitoras de la proliferación estudiadas aquí, abriéndose la posibilidad de que otra u otras señales activadas por CasNa conduzca a las células hacia la diferenciación. Así y aunque en principio resulta razonable considerar que pueda ser el M-CSF, en conjunto con el resto de los factores aquí evaluados el responsable directo de la inducción de diferenciación de las células 32D tratadas con CasNa, toda vez que este grupo de trabajo recientemente reportó que es inducido en las células 32D por efecto de CasNa, teniendo la capacidad para promover la formación de colonias del linaje monocito-macrófago por parte de células mononucleadas de médula ósea de ratón (Ramos *et al*, 2004), resultados preliminares de citometría de flujo parecen descartar que el M-CSF esté involucrado en la promoción de diferenciación macrofágica en cultivos con CasNa (datos no publicados).

Por lo anterior más que reanalizar la diferenciación de las células tratadas con CasNa en el contexto de múltiples anticuerpos neutralizantes en diferentes combinaciones, sería pertinente considerar fuertemente la posibilidad de que sea el caseinato de sodio el principal responsable de dirigir el comportamiento biológico de las células hematopoyéticas primitivas en su presencia, probablemente por la existencia de un receptor específico el cual se ha sugerido al menos para la caseína (Hira *et al*, 2003), en neutrófilos y monocitos humanos (Lewis & van Epps 1983).

Conclusión.

El CasNa abate la proliferación de las células 32D favoreciendo la diferenciación hacia el linaje monocito/macrófago, en el proceso se modula positivamente la expresión de mRNA para dos citocinas supresoras de la hematopoyesis (TNF- α e IFN- α) mientras que se induce la secreción a nivel de proteína de al menos tres inhibidores (TNF- α , TGF- β y CCL3/MIP-1 α); de los cuales solo TNF- α participa en la disminución de la proliferación celular, en tanto que ninguno mostró ser el responsable de la inducción de diferenciación macrofágica por parte de CasNa. Estos resultados revelan que el caseinato de sodio actúa como un modulador de la proliferación, diferenciación y expresión de citocinas y/o quimiocinas en las células hematopoyéticas, haciendo evidente que su relevancia biológica va más allá de la alimenticia.

Apéndice.

RT-PCR

Amortiguador de TBE 1X.

Tris, ácido bórico y EDTA, disuelto en agua estéril y desionizada.

Amortiguador de carga para RNA.

Glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0.01- 0.05% y xilencianol 0.5 % en agua DEPC

Mezcla de reacción para RT (10 uL de volumen final).

2.0 uL de $MgCl_2$ (25 mM), 1.0 uL de Buffer 10X, H_2O DEPC (la necesaria para un volumen final de 10 uL), 4.0 uL de dNTP's (10 mM), 0.5 uL de inhibidor de RNAsa (20 U/mL), y 0.5 uL de la transcriptasa reversa (MuLV) (50 U/uL), 0.5 uL del primer Oligo dT, 0.5 uL de ditiotreitil (DTT) (0.1 M).

Mezcla de reacción para PCR (50 uL de volumen final).

2.0 uL de $MgCl_2$ (25 mM), 4.0 uL de Buffer 10X, 28.35 uL de agua DEPC, 1 uL de dNTP's, 0.25 uL de DNA polimerasa 5 U/mL (Amplitaq), 0.2 uL del primer sentido y antisentido para β -actina (1 uM), 10 uL del cDNA, 2 uL del primer sentido y antisentido para la citocina de prueba.

Análisis de imagen.

Se eligió una imagen representativa del producto de RT-PCR para analizar la intensidad de cada banda en las imágenes obtenidas mediante el programa Collage versión 3.0 (Hartland WI USA) obteniendo un valor numérico. La intensidad de cada banda reportada por el software fue estandarizada comparando los valores de intensidad entre expresión TNF- α , TGF- β 1, CCL3/MIP-1 α o IFN- α respecto a β -actina (con y sin estímulo de CasNa) obteniéndose un cociente. Para observar la diferencia en el nivel de expresión de mRNA entre la citocina sin y con estímulo, se restó el cociente de la intensidad de la citocina con estímulo al valor del cociente sin estímulo (en unidades relativas basadas en β -actina), lo cual permitió conocer la modulación del mRNA para la citocina de prueba. El resultado final de la expresión observada fue graficado.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ELISA para TNF- α

Buffer de lavado.

Diluir 1 volumen de 25X buffer de lavado con 24 volúmenes de agua desionizada.

Dilución de estreptavidina-HRP.

Diluir 10 μ l de 100X estreptavidina-HRP con 1 mL de SHRPDiluyente.

ELISA para CCL3/MIP- α

Buffer de lavado.

4.5 NaCl
0.5 mL Tween20

Buffer de bloqueo (500 mL).

4 g NaCl
710 mg Na₂HPO₄·4.2H₂O
100 mg KH₂PO₄
100 mg KCl
2.5 g BSA

Buffer de captura A (200 mL)

1.6 g NaCl
284 mg Na₂HPO₄·2H₂O
40 mg KH₂PO₄
40 mg KCl

Dilución de estreptavidina-HRP.

Diluir 1 μ L de estreptavidina-HRP con 3750 μ L de buffer estándar A.

ELISA para TGF- β

Extracción de TGF- β del sobrenadante a probar.

250 μ L de sobrenadante a probar se adicionan a 50 μ L de solución de extracción, agitando mediante vortex e incubando 30 minutos a 4°C.

Buffer de lavado.

Diluir 1 volumen de 25X buffer de lavado con 24 volúmenes de agua desionizada.

Dilución de estreptavidina-HRP.

Diluir 10 μ l de 100X estreptavidina-HRP con 1 mL de SHRPDiluyente.

ELISA para IFN- α

Buffer de lavado.

Adicionar 25 mL de buffer de lavado concentrado a 475 mL de agua desionizada, almacenando antes y durante su uso a 4°C.

Dilución de anticuerpo conjugado.

Adicionar 50 μ l de anticuerpo biotin conjugado a 950 μ l de Buffer de dilución, llevando a 1 mL una alícuota de 16.7 μ L de la dilución previa.

Dilución de estreptavidina-HRP.

Adicionar 0.105 mL de HRP concentrado a 1 mL de SHRPDiluyente, alicuotar y almacenar a -70°C hasta su uso.

Extracción de células totales de bazo de ratón.

Se obtuvieron células totales de bazo de un ratón hembra Balb-C de entre 3 y 4 meses de edad como se describe previamente (Coligan *et al*, 1992). Después de sacrificar por dislocación cervical se extrajo el bazo y disgregó en un campo de nylon contra el fondo de una caja de petri conteniendo 3 mL de medio de cultivo IMDM suplementado con SFB. Posteriormente se colectó la muestra de la caja petri y centrifugó por 10 minutos a 1000 rpm, resuspendiendo el botón en 20 mL de medio para después centrifugar y descartar el sobrenadante. Se adicionaron 5 mL de buffer de lisis al botón, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente tras lo cual, se lavó y descartó el sobrenadante resuspendiendo el botón en medio de cultivo evaluando por conteo directo en hemocitómetro el número celular.

Ensayo de quimiotáxis.

Se cultivaron células totales de bazo de ratón a una densidad de 5×10^6 células/mL y marcaron con el fluoróforo calceína-AM por 15 minutos a 37°C a una concentración de 0.5 uM. Posteriormente se lavó 2 veces centrifugando a 1000 rpm por 4 minutos. El quimioatrayente (rmCCL3/MIP-1 α en curva dosis respuesta comenzando en 500 ng/mL) se cargó en una cámara modificada de Boyden (Neuroprobe AP48) por la parte inferior, considerando un control de CCL3/MIP-1 α recombinante mas anticuerpo neutralizante anti-CCL3/MIP-1 α de ratón. En la región intermedia se empleó una membrana de policarbonato con poros de 5 micras (Neuroprobe PFD5).

Las células marcadas se resuspendieron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) con calcio y magnesio (Gibco 14025076), cargandose en la parte superior de la cámara dejando por 1.5 horas a 37°C. Terminado el tiempo de incubación se desmontó la cámara y “rasparon” las células no migrantes con un scrapper (Neuroprobe P48AP) lavando con PBS. Posteriormente se dejó secar al aire y fijó con metanol, cuantificando la densidad de fluorescencia en un detector FX (Biorad).

Referencias.

- Aggarwal S, Gollapudi S, Gupta S. (1999). Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF-alpha receptor expression and activation of caspases. *J Immunol* 162: 2154.
- Aiyer R, Aggarwal B. (1998). Tumor necrosis factors. Handbook on cytolytic lymphocytes and complement: effectors of the immune system. Ed. Boca Raton Press, Florida. 132 pp.
- Aschkenasy A. (1971). Effets compares de la caseine et de divers melanges aminoacides sur la restauration de Lerythopoiese, de la neutropoiese et de la lymphopoiese chez des rats prepares par une privation prolongee de proteines. Nouvelles etudes. *Arch sci physiol* 25:415.
- Baker M, Chen X, Rotramel A, Nelson J, Kaufman D. (2003). Proinflammatory cytokines induce NF-kappaB-dependent/NO-independent chemokine gene expression in MIN6 beta cells.. *J Surg Res* 11: 295.
- Baker S, Reddy E. (1996). Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12: 1.
- Bang O, Ruscetti F, Leei M, Kim S, Birchenall-Roberts M. (1996). Transforming Growth Factor-b1 Modulates p107 Function in Myeloid Cells. *J BiolChem* 271: 7811.
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF-b complex: Implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431.
- Barrett J, Rollins J. (1997). Chemokines. *Blood* 90: 909.
- Baxter G, Kuo R, Jupp OJ, Vandenabeele P, MacEwan D. (1999). Tumor necrosis factor- α mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression. *J Biol Chem* 274: 2939.
- Besirli C, Dedwerthz R, Crowders R, Freeman R, Johnson D. (2003). Cytosine arabinoside rapidly activates Bax-dependent apoptosis and a delayed Bax-independent death pathway in sympathetic neurons. *Cell Death and Differentiation* 10: 1045.
- Beutler B, Cerami A. (1989). The biology of cachectin/TNF. A primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol.* 7: 625.
- Beyert R, Fiers W. (1998). Tumor necrosis factor and lymphotoxin. (Edit.) Mire-Sluis A. and Thorpe R. Cytokines. Ed. Academic Press Inc. San Diego. 335pp
- Bharat B, Jordan U. (1992). Human cytokines. Ed. Blackwell Scientific Publications, London 405 pp.
- Bigas A, Martin D, Milner L. (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* 18: 2324.
- Billard C. (1993). Interferons, a class of cytokines with a large therapeutic activity range. *Bull Cancer* 80: 741.
- Birchenall-Roberts M, Falk L, Kasper J, Kellerg J, Faltynekl C, Ruscetti F. (1991). Differential Expression of Transforming Growth Factor Receptors in Murine Myeloid Cell Lines Transformed with Oncogenes. *J Biol Chem* 266: 9617.

- Blackx B, Broeders L, Bot F, Lowenberg B. (1991). Positive and negative effects of tumor necrosis factor on colony growth from highly purified bone marrow progenitors. *Leukemia* 5: 66.
- Bombara C, Ignatz R. (1992). TGF-beta inhibits proliferation of and promotes differentiation of human promonocytic leukemia cells. *J Cell Physiol* 153: 30.
- Bonewald L, Mundy G. (1989). Role of transforming growth factor beta in bone remodeling: a review. *Connect Tissue Res* 23: 201.
- Boosalis M, Ikuta T, Pace S, da Fonseca S, White L, Faller V, Perrine P. (1997). Abrogation of IL-3 requirements and stimulation of hematopoietic cell proliferation in vitro and in vivo by carboxylic acids. *Blood Cell Mol Dis* 23: 434.
- Brown P, Wakefield L, Levinson A. (1990). Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-betas 1, 2, and 3. *Growth Factors* 3: 35.
- Broxmeyer H, Kim C. (1999). Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol*. 7: 1113.
- Broxmeyer H, Sherry B, Lu L, Cooper S, Tekamp-Olsen P, Kwon B, Cerami A. (1990). Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 76: 1110.
- Broxmeyer H, Sherry B, Lu L, Cooper S, Lu L, Maze R, Beckmann M, Cerami A, Ralph P. (1993). Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells. *J Immunol* 150: 3448.
- Broxmeyer H, Youn B, Kim C, Hango G, Cooper S, Mantel C. (2001). Chemokine regulation of hematopoiesis and the involvement of pertussis toxin-sensitive G alpha i proteins. *Ann N Y Acad Sci* 938: 117.
- Caraglia G, Vitale M, Marra S, Del Prete A, Lentini A, Budillon S, Beninati A. (2004). Translational and post-translational modifications of proteins as a new mechanism of action of Alpha-Interferon: Review article *Amino Acids* 26: 409.
- Cardoso A, Li M, Batard P. (1993). Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potential to engraft adults. *Proc Natl acad sci USA* 90: 8707.
- Cartwright G. (1973). *El laboratorio en el diagnostico hematológico*. Científico-medica Barcelona. 55p
- Cashman J, Eaves C, Sarris A, Eaves A. (1998). MIP-1 α is the endogenous chemoquine that cooperates with TGF- β to inhibit the cycling of primitive normal but not leukemic (CML) progenitor in long-term human marrow cultures. *Blood* 92: 2338.
- Caux C, Saeland S, Favre C, Dubert V, Mannoni P, Banchereau J. (1990). Tumor necrosis factor-alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitors cells. *Blood* 75: 2292.
- Caux C, Saeland S, Favre C, Dubert V, Mannoni P, Banchereau J. (1990). Tumor necrosis factor-alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitors cells. *Blood* 75: 2292.

Chawla-Sarkar M, Lindner D, Liu Y, Williams B, Sen C, Silverman R, Borden C. (2003). Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis *Apoptosis* 8: 237

Cheifetz S, Andres J, Massague J. (1988). The transforming growth factor- β receptor type III is a membrane proteoglycan: domain structure of the receptor. *J Biol Chem* 263: 16984.

Cheifetz S, Bassols A, Stanley K, Ohta M, Greenberger J, Massague J. (1988). Heterodimeric transforming growth factor beta. Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors. *J. Biol. Chem.* 263: 10783.

Cheng L, Yan Y, Wang O. (2003). Expression of hematopoietic inhibitory factors in mouse fibroblasts, macrophages and endothelial cells *Cell Biology International* 27: 739.

Cheng T, Shen H, Rodrigues N, Stler S, Scadden D. (2001). Transforming growth factor mediates cell cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21 or p27. *Blood* 98: 3643.

Chin D, Boyle G, Parsons P, William B. (2004). What is transforming growth factor-beta (TGF-b)? *Ann Plast Surg* 57: 215.

Clark S, Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236: 1229.

Clements J, Craig S, Gearing A. (1992). Biological and structural properties of MIP-1 alpha expressed in yeast. *Cytokine* 4: 76.

Cluitmans F, Esendam B, Landegent E, Willemze R, Falkenburg F. (1995). Constitutive in vivo cytokine and hematopoietic growth factor gene expression in the bone marrow and peripheral blood of healthy individuals. *Blood* 85: 2838.

Coligan J, Krusbeek A, Margulies D, Shevach E, Strober W. (1992). *Current protocols in immunology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience New York. 1001p

Cook D. (1996). The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 59: 61.

Corssmit E, de Metz J, Sauerwein H, Romijn J. (2000). Biologic responses to IFN-alpha administration in humans. *J Interferon Cytokine Res* 20: 1039.

Dallas S, Park-Snyder S, Miyazono K. (1994). Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor b (TGFb) complexes in osteoblast-like cell lines: production of a latent complex lacking the latent TGFb-binding protein. *J Biol Chem* 269: 6815.

Dalmau S, Freitas C, Savino W. (1997). Radio- and chemoprotection of bone marrow cells by opposite cell cycle-acting cytokines. *Leuk Res.* 2: 93.

Darnell J, Kerr I, Stark G. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415.

Darnell J. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277: 1633.

De Benedetti F, Falk L, Ellingsworth L, Ruscetti F, Faltynek C. (1990). Synergy between transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the induction of monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *Blood* 75: 626.

- Diaz M, Bohlander S, Allen G. (1993). Nomenclature of the human interferon genes. *J Interferon Res.* 13: 443.
- Digel W, Stefanic M, Schoniger W, Buck C, Raghavachar A, Frichhofen N, Heimpel H, Porzsolt F. (1989). Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 73: 1242.
- Diggs L. (1971). La morfología de las células de la sangre. Abbott Laboratories USA. 71pp.
- Dijke P, Goumans M, Itoh F, Itoh S. (2001). Regulation of cell proliferation by Smad Protein. *J cell physiol* 191: 1
- Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin C, Miyazono K. (1993). Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8: 2879.
- Drexler H, Meyer C, Zaborski M, Uphoff C, Quentmeier H. (1998). Growth-inhibitory effects of transforming growth factor-beta 1 on myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res* 22: 927.
- Driscoll K. (1994). Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp Lung Res* 20: 473.
- Duan H & Dixit V. (1997). RAIDD is a new death adapter molecule. *Nature* 385: 86.
- Dunlop D, Writh E, Lorimore S, Graham G, Holyoake T, Kerr D, Wolpe S, Pragnell I. (1992). Demonstration of stem cell inhibition and myeloprotective effects of SCI/rhMIP-1 α in vivo. *Blood* 79: 2221.
- Eaves C, Cashman M, Wolpe S. (1993b). Unresponsiveness of primitive chronic myeloid leukemia cells to macrophage inflammatory protein 1 alpha, an inhibitor of primitive normal hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 12019.
- Eaves C, Udomsakdi J, Cashman M, Barnett A. (1993a). The biology of normal and neoplastic stem cells in CML. *Leuk Lymphoma* 11: 245.
- Engelmann H, Holtmann H, Brakebusch C. (1990). Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J. Biol. Chem.* 265: 14497.
- Fahlman C, Jacobsen F, Veiby O, McNiece I, Blomhoff H, Jacobsen S. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) potently enhances in vitro macrophage production from primitive murine hematopoietic progenitor cells in combination with stem cell factor and interleukin-7: novel stimulatory role of p55 TNF receptors. *Blood* 84: 1528.
- Ferdy J, Curzio R, Danielle L. (1998). Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Op Immunol* 10: 573.
- Flesh I, Barsig J, Kaufmann S. (1998). Differential chemokines response of murine macrophages stimulated with cytokines and infected with *Listeria monocytogenes*. *Int immunol* 10: 757.
- Fortunel N, Hatzfeld J, Monier M, Hatzfeld A. (2003). Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor-beta. *Oncol Res.* 13: 445.

- Fortunel N, Hatzfield A, Hatzfield J. (2000). Transforming growth factor- β : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 96: 2022.
- Fransen L, Ruyschaert M, der Hieden W. (1986). Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. *Cell Immunol* 100: 260.
- Gao J, Kuhns H, Tiffany D, McDermott X, Li U, Francke P. (1993). Structure and functional expression of the human macro-phage inflammatory protein 1a/RANTES receptor. *J Exp Med* 177: 1421.
- Gentry L, Nash B. (1990). The pro-domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry* 29: 6851.
- Gleizes P, Munger J, Nunes I, Harpel J, Mazzieri R, Noguera I, Rifkin D. (1997). TGF-b Latency: Biological Significance and Mechanisms of Activation. *Stem cells* 15:190.
- González J. (2002). Efecto del caseinato de sodio (CasNa) en la expresión de los genes del TNF- α y TGF- β 1 en la línea celular mielóide 32D. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Graham G, Wilkinson P, Nibbs R. (1996). Uncoupling of stem cell inhibition from monocyte chemoattraction in MIP-1 alpha by mutagenesis of the proteoglycan binding site. *Embo J* 15: 6506.
- Graham G, Wright E, Hewick R, Wolpe S, Wilkie N, Donaldson D, Lorimore S, Pragnell I. (1990). Identification and characterization of an inhibitor of hematopoietic stem cell proliferation. *Nature* 344: 442.
- 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.
- Gresser I. (1997). Wherefore interferon?. *J Leukoc Biol.* 61: 567.
- Grooten J, Goosens V, Vanhaesebroeck B, Fiers W. (1993). Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. *Cytokine* 5: 546.
- Gross A, Spiesser S, Terraza A, Rouot B, Caron E, Dornand J. (1998). Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in *Brucella suis*-infected murine macrophages. *Infect Immun.* 66: 1309.
- Grzegorzewski K, Ruscetti F, Usui N. (1994). Recombinant transforming factor b1 and b2 protect mice from acutely lethal doses of 5-fluorouracil and doxorubicin. *J Exp Med* 180: 1047.
- Haitham T, Naismith I, Naismith J. (2000). TNFa and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s) *Micro research tech* 50: 184
- Hall C. (1971). *Drying of milk and products*. 2a edition. Ed. The Avi Pub Company Inc USA. 111 pp.
- Hamblin A. (1993). *Cytokines and cytokine receptors*. Ed. IRL Press Oxford University Press, London. 90 pp.
- Haque S, Williams B. (1998). Signal transduction in the inter-feron system. *Semin Oncol* 25: 14.
- Hara T, Bacon K, Cho LC, Yoshimura A, Morikawa Y, Copeland N, Gilbert D, Jenkins N, Schall T, Miyajima A. (1995). Molecular cloning and functional characterization of a novel member of the C-C chemokine family. *J Immunol.* 155: 5352.

- Harousseau J. (1997). Clinical value of interferon-alpha in the treatment of malignant hematologic diseases. *Presse Med* 26: 857.
- Harris K, Hu X, Schultz S, Arcasoy M, Forget B, Clare N. (1998). The distal cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor induces granulocytic differentiation in 32D cells. *Blood* 92: 1219.
- Hashimoto H, Hanazawa S. (1990). Inducing effect of tumor necrosis factor-alpha on differentiation of U937 monocytic tumor cell line. *Meikai Daigaku Shigaku Zasshi* 19: 267.
- Hassan H, Grell S, Borrmann-Danso U, Freund M. (1995). Effect of recombinant human interferons in inducing differentiation of acute megakaryoblastic leukaemia blast cells. *Leuk Lymphoma* 16: 329.
- Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivalou. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes dev* 12: 186.
- Heldin C, Miyazono K, Dijke P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465.
- Herbein G & O'Brien W. (2000). Tumor necrosis factor and TNF receptors in viral pathogenesis. *PSBEM* 223: 241.
- Hestall K, Ruscetti F, Ihle J, Jacobsen S, Dubios C, Kopp W, Longo D, Keller J. (1991). Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J immunol* 147: 22.
- Hira T, Hara H, Tomita F, Aoyama Y. (2003). Casein bind to the cell membrane and induces intracellular calcium signal in the enteroendocrine cell: a brief communication. *Exp biol med* 228: 850.
- Hsu H, Shu H, Pan M, Goeddel D. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathway. *Cell* 84: 299.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel D. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kB activation. *Cell* 81: 495.
- Hu C, Chien L. (1998). The cytoplasmic domain of stem cell antigen CD34 is essential for cytoadhesion signaling but not sufficient for proliferation signaling. *Blood* 91: 1152.
- Hughes-Jones N, Wickramasinghe E. (1991). *Lecture notes on haematology*. Ed. Blackwell Scientific Publications, London. 225 pp.
- Hussain M, Ni D, Gill D, Liao M. (2000). IFN-alpha1a gene is the major variant in the North American population. *J Interferon Cytokine Res* 20: 763.
- Ihle J. (1996). STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84: 331.
- Imada K, Leonard W. (2000). The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 37: 1.
- Imanishi J. (1994). Interferon-alpha, beta, gamma. *Gan To Kagaku Ryoho* 21: 2853.
- Inoue K, Tamaki H, Ogawa H, Oka Y, Soma T, Tatekawa T, Oji Y, Tsuboi A, Kim H, Kawakami M, Akiyama T, Kishimoto T, Sugiyama H. (1998). Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. *Blood* 91: 2969.

- Jacobsen S, Keller J, Ruscetti F, Kondalah P, Roberts A, Falk L. (1991). Bidirectional effects of transforming growth factor- β (TGF- β) on colony-stimulating factor induced human myelopoiesis in vitro: differential effects of distinct TGF- β isoforms. *Blood* 78: 2239.
- Jacobsen S, Ruscetti F, Ortiz M, Gooya J, Keller J. (1994). The growth response of Lin-Thy-1+ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy of multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. *Exp Hematol* 22: 985.
- Jacobsen S, Veiby O, Myklebust J, Okkenhaug C, Lyman S. (1996). Ability of flt3 ligand to stimulate the in vitro growth of primitive murine hematopoietic progenitors is directly inhibited by transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alfa. *Blood* 87: 5016.
- Jakowlew S, Dillard P, Sporn M, Roberts A. (1988). Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor b4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol* 2: 1186.
- Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak M. (2001). Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem cells* 19: 99.
- Johnsen A, France J, Sy M, Harding C. (1998). Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Research*. 58: 3660.
- Jonasch E, Haluska F. (2001). Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist* 6: 34.
- Jones E, Stuart D, Walker N. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338: 225.
- Jue D, Sherry B, Luedke C. (1990). Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochem* 29: 8371.
- Kamijo R, Takeda K, Nagumo M, Konno K. (1990). Effects of combinations of transforming growth factor-beta 1 and tumor necrosis factor on induction of differentiation of human myelogenous leukemic cell lines. *J Immunol* 4: 1311.
- Karkanitsa L, Komarovskaya M, Krivenko S. (1997). Abrogation of radiation injury to human hematopoietic stem cells with tumor necrosis factor-alpha. *Stem Cells*. 2: 95.
- Kawahara T, Katayama D, Otan H. (2004). Effect of beta-casein on proliferative response and secretory functions of human immunocompetent cell lines. *Biosci Biotechnol biochem* 68: 2091
- Keller J, Bartelmez S, Sitnicka E, Ruscetti F, Ortiz M, Goya J, Jacobsen S. (1994). Distinct and overlapping direct effects of macrophage inflammatory protein -1 α and transforming growth factor β on hematopoietic progenitor/stem cell growth. *Blood* 84: 2175.
- Keller J, McNiece I, Sill K. (1990). Transforming growth factor- β 1 directly regulates primitive murine hematopoietic cell proliferation. *Blood* 75: 596.
- Kharbanda S, Nakamura T, Datta R, Sherman ML, Kufe D. (1990). Induction of monocytic differentiation by tumor necrosis factor in phorbol ester-resistant KG-1a cells. *Cancer Commun* 2: 327.
- Kim S, Letterio J. (2003). Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 17: 1731.

- Kirkwood J. (2002). Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol* 29: 18.
- Kirstein M, Fiers W, Baglioni C. (1986). Growth inhibition and cytotoxicity of tumor necrosis factor in L929 cells is enhanced by high cell density and inhibition of mRNA synthesis. *J Immunol* 137: 2277.
- Koletzko B, Agget P, Bindels J, Bong P, Ferre P, Gil A, Lentze M, Robertfroid M, Strobel S. (1998). Growth development and differentiation: a functional food science approach. *British J Nutrition* 80: S45.
- Kon s. (1977). *La leche y los productos lácteos en la nutrición humana*. 2ª ed. FAO Rumania
- Kondalah P, Sands M, Smith J. (1990). Identification of a novel transforming growth factor β (TGF- β 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 256: 1089.
- Koyasu S, Yodoy J, Nikaido T, Tagaya Y, Taniguchi Y, Honjo T, Yahara, I. (1996). Expression of interleukin 2 receptors on interleukin 3-dependent cell lines. *J Immunol* 138: 478.
- Kreider B, Phillips D, Prystowsky B, Shirsat N, Pierce H, Tushinski R, Rovera G. (1990). Induction of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor by granulocyte CSF increases the differentiative options of a murine hematopoietic progenitor cell. *Mol Cel Biol* 10: 4846.
- Lacotte-Thierry L, Guilhot F. (2002). Interferons and hematology. *Rev Med Interne* 4: 481.
- Lange W, Brugger F, Rosenthal L, Kanz A, Lindemann A. (1991). The role of cytokines in oncology. *Int J Cell Cloning* 9: 252.
- Lange W, Brugger F, Rosenthal L, Kanz A, Lindemann A. (1991). The role of cytokines in oncology. *Int J Cell Cloning* 9: 252.
- Larsson J, Karlsson S. (2005). The role of smad signaling in hemayopoiesis. *Oncogene* 24: 5676.
- Lau A, Lehman D, Geertsma F, Yeung M. (1996). Biology and therapeutic uses of myeloid hematopoietic growth factors and interferons. *Pediatr Infect Dis J* 15: 563.
- Lauta V. (1995). Interferon and chronic myelogenous leukaemia. *Med Oncol* 12: 41.
- Lawler S, Feng X, Chen R, Maruoka E, Turck C, Grisworls P, Derynck R. (1997). The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* 272: 14850
- Ledesma E, Martínez I, Córdova Y, Rodríguez-Sosa M, Monroy A, Mora L, Soto I, Ramos G, Weiss B, Santiago E. (2004). Interleukin-1 beta (IL-1b) induces tumor necrosis factor alpha (TNF-a) expression on mouse myeloid multipotent cell line 32D cl3 and inhibits their proliferation. *Cytokine* 26: 66.
- Leung K, Mak N, Fung M, Hapel A. Synergistic effect of IL-4 and TNF-alpha in the induction of monocytic differentiation of a mouse myeloid leukaemic cell line (WEHI-3B JCS). *Immunology* 81: 65.
- Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice G, Wong W, Chen Y, And Goeddel V. (1991). Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 2830.
- Lewis S, van Epps. (1983). Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation* 7: 363.

- Li W, Huang W, Huang Y, Jiang D, Wang Q. (2000). Positive and negative hematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells. *Cytokine*. 12: 1017.
- Liesveld J, Harbol A, Belanger T, Rosell K, Abboud C. (2000). MIP-1alpha and TGF-beta production in CD34+ progenitor-stromal cell coculture systems: effects of progenitor isolation method and cell-cell contact. *Blood Cells Mol Dis* 26: 261.
- Lin H, Wang X, Ng-Eaton E, Weinberg R, Lodish H. (1992). Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell*. 68: 775.
- Liu Z, Hsu H, Goeddel D, Karin M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kB activation prevents cell death. *Cell* 87: 565.
- Loetscher H, Steinmetz M, Lesslauer W. (1991). Tumor necrosis factor: receptor and inhibitors. *Cancer Cells* 3: 221.
- Lord B, Heyworth C, Woolford L. (1993). Macrophage inflammatory protein: its characteristics, biological properties and role in the regulation of haemopoiesis. *Int J Hematol* 57: 197.
- Lotem J, Sachs L. (1985). Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins in vivo: regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer* 35: 93.
- Lowenthal W, Castla E, Christiansen J, Schreurs J, Rennick D, Arai N, Hoy P, Takebe Y, Howard M. (1988). Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hematopoietic and non-hematopoietic cells. *J Immunol* 140: 456.
- Lu L, Heinrich M, Wang L, Dai M, Zigler A, Chai L, Broxmeyer H. (1999). Retroviral-mediated gene transduction of c-kit into single hematopoietic progenitor cells from cord blood enhances erythroid colony formation and decreases sensitivity to inhibition by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1. *Blood* 7: 2319.
- Lu L, Xiao M, Grigsby S, Wang L, Wu B, Shen R, Broxmeyer H. (1993). Comparative effects of suppressive cytokines on isolated single CD34+++ stem/progenitor cells from human bone marrow and umbilical cordon blood plated with and without serum. *Exp Hematol* 21: 1442.
- Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska A, Gewirtz M, Emerson S, Ratajczak M. (2001). Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblast, erithroblast, and megakaryoblast and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97: 3075.
- Mak N, Fung M, Leung K, Hapel A. Monocytic differentiation of a myelomonocytic leukemic cell (WEHI 3B JCS) is induced by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha). *Cell Immunol* 150: 1.
- Malinin N, Boldin M, Kovalenko A, Wallach D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NFkB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385: 540.
- Martinez-Jaramillo G, Flores-Figueroa E, Gómez-Morales E, Sánchez-Valle E, Mayani H. (2001). Tumor necrosis factor-alpha levels in long-term marrow cultures from patients with aplastic anemia: modulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Hematol* 3:144.
- Massague J. (1998). TGF signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 67:753.

- Matsui W, Huff C, Vala M, Barber J, Smith B, Jones R. (2003). Anti-tumour activity of interferon-alpha in multiple myeloma: role of interleukin 6 and tumor cell differentiation. *Br J Haematol* 121: 251.
- Matthews L & Vale W (1991). Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65: 973.
- Maurer E, von Stebut. (2004). Macrophage inflammatory protein 1. *IJBCB* 10: 1883.
- Maze R, Sherry B, Cerami A, Broxmeyer H. (1992). Myelosuppressive effects in vivo of purified recombinant murine macrophage inflammatory protein-1 α . *J Immunol* 149: 1004.
- McDonald G, Paul J, Cruickshank H. (1998). Atlas de hematología. Madrid-México Panamericana. 201pp.
- Meager A. (1991). Cytokines. Ed. Prentice Hall, New Jersey. 291 pp
- Menten P, Wuyts A, von Damme. (2002). Macrophage inflammatory protein 1. *Cytokine Growth Factor review* 13: 455.
- Metcalf B. (1985). Multi-CSF-depend clony formation by cells of a murine hematopoietic cell line : specificity and action of multi-CSF. *Blood* 65: 357.
- Metcalf D, Robb L, Dunn A, Mifsud S, Rago L. (1997). 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.
- Metcalf D. (1998). Cell-cell signaling in the regulation of blood cell formation and function. *Immunol Cell Biol* 76: 441.
- Migliaccio G, Migliaccio A, Kreider, B, Rovera, G, Adamson J. (1989). Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at differentiation from the murine cell line 32D. *J Cell Biol* 109: 833.
- Miller H, Rouwe B, Gaitanos N, Hood A, Crume P, Backstrom T, Flamme M, Berridge V, Northcote T. (2004). Peloruside A enhances apoptosis in H-ras- transformed cells and is cytotoxic to proliferating T cells. *Apoptosis* 9: 578.
- Miller H, Wright S, Knight P, Thornton E. (1999). A novel function for transforming growth factor-beta1: upregulation of the expression and the IgE-independent extracellular release of a mucosal mast cell granule-specific beta-chymase, mouse mast cell protease-1. *Blood* 93: 3473.
- Miller J, Rouwe B, Gaitanos T, Hood K, Crume B, Berridge V, Northcote P. (2004). Peloruside A enhances apoptosis in H-ras-transformed cells and is cytotoxic to proliferating T cells. *Apoptosis* 9: 785.
- Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C. (1988). Latent high molecular weight complex of transforming growth factor b1. *J Biol Chem* 263: 6407.
- Morrison S, Uchida N, Weissman I. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 35.
- Munker R, Hiller E, Paquette R. (1998). Modern hematology. Biology and clinical management. Ed. Human Press, New Jersey. 369 pp

- Murphy M, Perussia B, Trincheri G. (1988). Effects of recombinant tumor necrosis factor, lymphotoxin, and immune interferon on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 16: 131.
- Natoli G, Costanzo A, Guido F, Moretti F, Levrero M. (1998). Apoptotic, Non-apoptotic, and Anti-apoptotic Pathways of Tumor Necrosis Factor Signalling. *Bioche Pharm* 56: 915.
- Natoli G, Costanzo A, Moretti F, Fulco M, Balsano C, Levrero M (1997). Tumor necrosis factor receptor 1 signaling downstream of TRAF2. NIK requirement for activation of AP1 and NFkB but not of JNK/SAPK. *J Biol Chem* 272: 26079.
- Neer J. (1994). G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* 3: 3.
- Negrier M, Pourreau C, Palemr P. (1992). Phase I trial of recombinant interleukin-2 followed by tumor necrosis factor in patients with metastatic cancer. *J Immunother* 11: 93
- Neta R, Oppenheim J, Douches D. (1988). Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin-1 α , tumor necrosis factor- α , granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 140: 108.
- New D, Wong Y. (2003). Chemokine receptor-cupled signalling pathways. *Acta Biochemica* 35: 779.
- Ogawa M, Matsunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Annu Acad Sci* 872: 17.
- Okano M, Hideki O, Sasaki R. (1991). Protein deficiency impars erythropoiesis in rats reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythoid precursors cells. *J Nutr* 122: 1376.
- Oppenheim J, Zacharial N, Mukaida C, Matsushima R. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine". *Annu Rev Immunol* 9: 617.
- Oreffo R, Mundy G, Seyedin S. (1989). Activation of the bonederived latent TGF-beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 817.
- Oritani K, Kanakura Y. (2005). IFN- ζ limitin: a member of type I IFN with mild limpho-myelosuppression. *J Cell Mol Med* 2: 244.
- Orkin S. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270: 4955.
- Orlic D, Bodine D. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up!. *Blood* 84: 2991.
- Oster W, Lindemann A, Horn S, Mertelsmann R, Herrmann F. (1987). Tumor necrosis factor (TNF)-alpha but not TNFbeta induces secretion of colony stimulating factor for macrophages (CSF-1) by human monocytes. *Blood* 70: 1700.
- Otani H, Hata I. (1995). Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. *J Dairy Res.* 2: 339.
- Parkinson E, Graham P, Daubersies J, Burns C, Heufler M, Plumb G, Schuler I. (1993). Hematopoietic stem cell inhibitor (SCI. MIP-1 alpha) also inhibits clonogenic epidermal keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* 101: 113.

- Pascal C, Snoeck H, Lardon F, Lenjou M, Nijs G, Weekx S, Rodrigus I, Berneman Z, Bockstaele D. (1996). TGF- β and MIP-1 α exert their main inhibitory activity on very primitive CD34⁺⁺CD38⁻ cells but show opposite effects on more mature CD34⁺CD38⁺ human hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 24: 1509.
- Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Friego G. (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 2: 71.
- Patel VP, Kreider BL, Li Y, Li H, Leung K, Salcedo T, Nardelli B, Pippalla V, Gentz S, Thotakura R, Parmelee D, Gentz R, Garotta G. (1997). Molecular and functional characterization of two novel human C-C chemokines as inhibitors of two distinct classes of myeloid progenitors. *J Exp Med* 185:1163,
- Pennica D, Nedwin G, Hayflick J, Seeburg P, Derynck R, Palladino M, Kohr W, Aggarwal B, Goeddel D. (1984). Human tumor necrosis factor: Pre-cursor structure, expression, and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724.
- Pestka S. (1997). The human interferon-alpha species and hybrid proteins. *Semin Oncol* 24: 17.
- Pfeffer L, Dinarello C, Herberman R, Williams B, Borden E, Bordens R, Walter M, Nagabhushan T, Trotta P, Pestka S. (1998). Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res.* 58: 2489.
- Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, Neuwirtova R, Cermak J, Necas E, Andera L, Stopka T. (2002). TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia.* 16: 67.
- Platanias L, Fish E. (1999). Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol* 27: 1583.
- Pluznik D, Sachs A. (1965) The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66: 319.
- Ramos C, Canetti C, Souto J, Silva S, Hogaboam C, Ferreira S, Cunha F. (2005). MIP-1 [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF and LTB4. *J Leuk Biol* 78: 1.
- Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. (2000). El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Inv Clin* 52: 638.
- Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. (2004). Sodium caseinate induces the murine multipotent myeloid cell line 32D to express and secrete the macrophage colony stimulating factor (M-CSF). *Arch Med Res.* 109: 113
- Ranst P, Snoeck H, Lardon F. (1996). TGF β and MIP α exert their main inhibitory activity on very primitive CD34⁺⁺CD38⁻ cells but show opposite effects on more mature CD34⁺CD38⁺ human hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 24: 1509.
- Rath P, Aggarwal B. (1999). TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19: 350.
- Reinhard C, Shamoan B, Shyamala V, Williams L. (1997). Tumor necrosis factor α -induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J* 16: 1080.
- Roberts A, Sporn M. (1992). Transforming growth factor beta (Edit.) Bharat B. and Jordan U. Human cytokines. Ed. Blackwell Scientific Publications, London. 405 pp.
- Rothe M, Pan M, Henzel W, Ayres T, Goeddel D. (1995a). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83: 1243.

- Rothe M, Sarma V, Dixit V, Goeddel D. (1995b). TRAF2-mediated activation of NF κ B by TNF-receptor 2 and CD40. *Science* 269: 1424.
- Ruscetti F, Bartelmez S. (2001). Transforming growth factor beta, pleiotropic regulator of hematopoietic stem cells: potential physiological and clinical relevance. *Int J Hematol.* 74: 18.
- Ruscetti F, Birchendall R, McPherson J, Wiltrot R. (1998). Transforming growth factor beta 1. Edit. Mire-Sluis A. and Thorpe R. Cytokines. Ed. Academic Press, San Diego. 584 pp.
- Russo D, Tell G, Marin L, Tribelli M, Santucci A, Pucillo C. (1999). All-trans retinoic acid potentiates the in vitro inhibitory effects of IFN alpha in parental and p210-bcr/abl transfected murine myeloid cell lines. *Haematologica* 84: 955.
- Rusten L, Smeland E, Jacobsen F, Lien E, Lesslauer W, Loetscher H, Dubois C, Jacobsen S. (1994). Tumor necrosis factor-alpha inhibits stem cell factor-induced proliferation of human bone marrow progenitor cells in vitro. Role of p55 and p75 tumor necrosis factor receptors. *J Clin Invest* 94: 165.
- Saharinen J, Taipale J, Monni O, Keski-Oja J. (1998). Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-b binding protein LTBP-4 L. *Biol Chem* 273: 18459.
- Sanchez X, Suetomi K, Cousins-Hodges B, Horton K, Navarro J. (1998). CXC chemokines suppress proliferation of myeloid progenitor cells by activation of the CXC chemokine receptor 2. *J Immunol* 160: 906.
- Santiago E, Mora L, Montesinos J, Ventura J, Machuca C, Mendoza J. (1994). Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblast. *Rev Inv Clin (Suppl)* I: 253.
- Sarris A, Broxmeyer H, Wirthmueller U, Karasavvas N, Cooper S, Lu L, Krueger J, Ravetch J. (1993). Human interferon-inducible protein 10: expression and purification of recombinant protein demonstrate inhibition of early human hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 178: 1127.
- Schall T. (1994). The chemokines. In *The Cytokine Handbook*. 2a Edit. Thompson. A. Ed. Academic Press. London. 419 pp.
- Schiavoni G, Mattei F, Di Pucchio T, Santini S, Bracci L, Belardelli F, Proietti E. (2000) Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44hi T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood* 95: 2024.
- Schmid D, Tite J, Ruddle N. (1986). DNA fragmentation: manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting supernatant. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1881.
- Schneider J, Moore M. (1991). TGF but not macrophage inflammatory protein abrogates IL-1 and cKit ligand (KL) induced proliferation of murine high proliferative potential (HPP) colonies. *Blood* 78: 259.
- Sian E, Lucas G, Graham G, Russell N, Mottram R, Whetton A, Buckle A. (1999). Macrophage-Inflammatory Protein-1 a Receptor Expression on Normal and Chronic Myeloid Leukemia CD34 Cells. *J Immunol* 162: 6191.
- Sidhu R, Bollon A. (1993). Tumor necrosis factor activities and cancer therapy. A perspective. *Parmacol Ther* 57: 79.
- Smith C, Davis T, Anderson D. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248:1019.

- Smith R, Baglioni C. (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 262: 6951.
- Song H, Regnier C, Kirschning C, Goeddel D, Rothe M. (1997). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: Bifurcation of nuclear factor- κ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9792.
- Souchelnytskyi S, ten Dijke P, Miyazono K and Heldin C-H. (1996). Phosphorylation of Ser165 in TGF- β type I receptor modulates TGF- β 1-induced cellular responses. *The EMBO Journal* 15: 6231.
- Sreevalsan T. (1995). Biological therapy with Interferon- α and β : preclinical studies. In: DeVita V, Hellman S, Rosenberg S. Edit. *Biologic Therapy of Cancer*. Ed. Philadelphia. J.B. Lippincott Company. 347 pp.
- Sugarman B, Aggarwal B, Hass P, Figari I, Palladino M, Shepard H. (1985). Recombinant human necrosis factor α : effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science* 230: 293.
- Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon M, van Rooijen N, Stehling M, Drevets D, Leenen P. (2004). Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response. *J Immunol* 172: 4410.
- Tae H., Grossmann M, Ji J. (1998). G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 273: 17299.
- Taichman R, Reilly M, Matthews L. (2000). Human osteoblast-like cells and osteosarcoma cell lines synthesize macrophage inhibitory protein 1 α in response to interleukin 1 β and tumour necrosis factor α stimulation *in vitro*. *Br J Haematol.* 108: 275.
- Takeda K, Akira S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 199.
- Tatsuta M, Lishi H, Baba M, Taniguchi H. (1992). Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in Wistar rats fed a low-protein diet. *Int J Cancer* 50: 108.
- Tepper R, Coffman R, Leder P. (1992). An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *science* 157: 548.
- Theodorescu D, Bergsma D, Man M. (1991). Cloning and overexpression of TGF- β 1 cDNA in a mammary adenocarcinoma: *in vitro* and *in vivo* effects. *Growth Factors* 5: 305.
- Thoma B, Grell M, Pfizenmaier K, Scheurich P. (1990). Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *J. Exp. Med.* 172:1019.
- Tilg H, Peschel C. (1996). Interferon- α and its effects on the cytokine cascade: a pro- and anti-inflammatory cytokine. *Leuk Lymphoma* 23: 55.
- Tilg H. (1997). New insights into the mechanisms of interferon α : an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology* 112: 1017.
- Touhami M, Fauvel-Lafeve F, Da Silva N, Chomienne C, Legrand C. (1997). Induction of thrombospondin-1 by all-trans retinoic acid modulates growth and differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Leukemia* 11: 2137.
- Tracey K, Cerami A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med* 45: 491.

- Trinchieri G, Murphy M, Perussia B. (1987). Regulation of hematopoiesis by T lymphocytes and natural killers cells. *CRS Crit Rev Oncol Hematol* 7: 219.
- Tsao J, Tojo A, Fukamachi H, Kitamura T, Saito T, Urabe A, Takaku F. (1988). Expression of the functional erythropoietin receptors on interleukin 3-depend murine cell lines. *J Immunol* 140: 89.
- Turley J, Falk L, Ruscetti F, Kasper J, Francomano T, Fu T, Bang O, Birchenall-Roberts M. (1996). Transforming growth factor beta 1 functions in monocytic differentiation of hematopoietic cells through autocrine and paracrine mechanisms. *Cell Growth Differ* 7: 1535.
- Valtieri M, Tweardy D, Caracciolo D, Jhonson K, Mavilio F, Altman S, Santoli D, Rovera G. (1987). Cytokine-dependent granulocytic differentiation. *J Immunol* 11: 3829.
- Varfolomeev E, Boldin M, Goncharov T, Wallach D. (1996). A potential mechanism of crosstalk between the p55 TNFR and Fas/APO1. *J exp med* 183: 1271.
- Verfaillie C, Catanzarro M, Li N. (1994). Macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin 3 and diffusible marrow stromal factors maintain human hematopoietic stem cells for at least eight weeks in vitro. *J Exp Med* 179: 643.
- Verfaillie C, Miller J. (1995). A novel single-cell proliferation assay shows that long-term culture-initiating cell (LTC-IC) maintenance over time results from the extensive proliferation of a small fraction of LTC-IC. *Blood* 86: 2137.
- Vilcek J, Palombella V, de Stephamo D, Swenson C, Feinman R, Hirai R, Tsujimoto M. (1986). Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 163: 1632.
- Walstra P, Jenners R. (1984) *Dairy chemistry and physics*. Ed. Jhon Wiley Sons, New York, USA. 106 pp.
- Warner J. (1976). *Principios de la tecnología de lácteos*. Ed. AGT editor. México. 256 pp.
- Watanabe M, Shimamoto Y, Matsumoto T, Yoshida S, Kohashi O, Sunaga T. (1996). Effects of interferon-alpha, beta, and gamma on the function of differentiated leukemic HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Interferon Cytokine Res* 16: 347.
- Weber C, Aepfelbacher M, Haag H, Ziegler-Heitbrock H, Weber P. (1993). Tumor necrosis factor induces enhanced responses to platelet-activating factor and differentiation in human monocytic Mono Mac 6 cells. *Eur J Immunol* 23: 852.
- Weissman I. (2000). Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100: 157.
- Wetzler M, Talpaz M, Lowe DG, Baiocchi G, Gutterman JU, Kurzrock R. (1991). Constitutive expression of leukemia inhibitory factor RNA by human bone marrow stromal cells and modulation by IL-1, TNF-alpha, and TGF-beta. *Exp Hematol*. 19:347.
- Wisniewski D, Strife A, Atzpodien J, Clarkson B. (1987). Recombinant human tumor necrosis factor alpha and beta stimulate fibroblast to produce hematopoietic growth factors in vitro. *J immunol* 140: 840.
- Wolpe S, Cerami A. (1989). Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J* 3: 2565.

- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 370: 341.
- Xu D, Yoder M, Sutton J, Hromas R. (1998). Forced expression of Genesis, a winged helix transcriptional repressor isolated from embryonic stem cells, blocks granulocytic differentiation of 32D myeloid cells. *Leukemia* 12: 207.
- Yamaguchi M, Nadler S, Lee J, Deeg H. (1999). Induction of negative regulators of haematopoiesis in human bone marrow cells by HLA-DR cross-linking. *Transpl Immunol* 3: 159.
- Yamauchi H, Sakai I, Narumi H, Takeuchi K, Soga S, Fujita S. (2001). Development of interferon-alpha resistant subline from human chronic myelogenous leukemia cell line KT-1. *Intern Med* 40: 607.
- Youn B, Jang I, Broxmeyer H, Cooper S, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N, Elick T, Fraser MJ, Kwon B. (1995). A novel chemokine, macrophage inflammatory protein-related protein-2, inhibits colony formation of bone marrow myeloid progenitors. *J Immunol* 155: 2661.
- Yuan J. (1997). Transducin signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol*. 9: 247.
- Zheng L, Fisher G, Miller RE, Perschon J, Lynch DH, And Lenardo MJ. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 377: 348.