

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CÁNCER

ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN "*In vivo*" DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS DE  
MÉDULA ÓSEA EN RATONES INYECTADOS CON CASEINATO DE SODIO (CasNa).

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A:  
**NORMA MARTÍNEZ VÁZQUEZ**

Director de Tesis: Dr. Edelmiro Santiago Osorio  
Asesor de Tesis: M en C Ángel García Sánchez

MÉXICO, D.F.

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.

## DEDICATORIA

A mis:

Padres: Luisa Guadalupe Vásquez y Alfonso Martínez

Hermanos: Lourdes , David, Jorge y Cuauhtemoc

Prima María de Jesús quien considero mi hermana

Cuñadas y cuñado: María, Catalina, Rosalía y Rafael

Sobrinas: Karen, Danae, Mari cruz, Dalia y Miriam

Tíos, Primos, Sobrinos y demás familiares

Amigas y amigos.

Abuelos Maternos Rafael Vásquez (q.e.p.d.), Juana Martínez (q.e.p.d.),

Abuelos paternos Jorge Martínez y Margarita Merced

Al Dr. Edelmiro Santiago O. por todo su apoyo

Al M en C. Ángel García S.

A la Q.F.B. Domitila Burgos

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padre Alfonso Martínez

Quiero darte las gracias porque me has: enseñado a ser una persona de provecho, aconsejado que aún en los mayores problemas y adversidades la solución nunca será rendirse. Instruido en el verdadero sentido de la humildad y dado el ejemplo de que en esta vida triunfa el que persevera, ya que únicamente trasciende aquel que aporta algo a los demás. Gracias por inculcarme el sentido de la responsabilidad que me ha permitido convertirme en una mujer de principios. Siempre serás el ejemplo a seguir porque eres incansable y desde que tengo memoria nos inculcaste a mis hermanos y a mí el estudio, a pesar de todos los sacrificios que hiciste y que tuviste que pasar.

A mi madre Lupita:

Quiero agradecerte por que me diste la vida, por que con tus cuidados de madre ahora estoy aquí, has estado presente cuando más lo he necesitado, en los momentos de alegría y de felicidad para alentarme y en los momentos de dolor y tristeza para consolarme. Has respetado mi individualidad indicándome que sola yo debo resolver mis problemas, aleccionándome a tener sangre fría en los momentos de crisis y honor, y cautela en los momentos de triunfo. A sumar tus virtudes y las mías, no permitiendo tus errores indicándome que en esta vida es innecesario andar de nueva cuenta en el camino equivocado. Pero sobre todo, me siento afortunada por contar con una amiga como tú,

A ambos

A quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: amor, sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en profesionista, nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por sus sabios consejos y sus regaños he aprendido a valorar

la vida.

A mis hermanos Gracias

Lulú porque desde niña me cuidaste, enseñarme tantas cosas, transmitiéndome todos tus conocimientos y tus sabios consejos que han sido de gran ayuda para fortalecerme como persona, por apoyarme en todos los sentidos, por ser el ejemplo a seguir como hermana mayor, ser mi gran amiga de toda la vida. Sin tu ayuda no estuviera en la máxima casa de estudios. Y en los momentos más difíciles de mi carrera me alentaste sin permitir que me diera por vencida, finalmente por la colaboración en la revisión de mi tesis.

David por darme clases de matemáticas y aportarme de tú sabiduría, tus consejos para que no me diera por vencida, y que me han ayudado a crecer como persona, cuidarme, quererme tanto y por confiar en mí.

Jorge por las enseñanzas y apoyo que me brindaste en todas mis tareas, por que siempre has sabido ser un amigo para mí, por todos los consejos que siempre me das, porque cuando más débil me he sentido, no dejas que caiga, por quererme mucho y consentirme.

Cuauhtemoc: te agradezco por que de niños fuiste mi amigo y jugábamos juntos, por que de grandes me has dado consejos que me han servido para superarme, por enseñarme y ayudarme en mis trabajos de computación.

A los cuatro

Por todo el apoyo moral, social y económico que siempre me han brindado pues sin su ayuda no hubiera logrado ser una profesionista. Por ser los mejores hermanos que tengo y la unión que tenemos. Los quiero mucho.

A mi Cuñado Rafael Salas por su apoyo en la revisión de los artículos y tesis.

A mis amigas:

Letis's, María Engracia,

Por que desde que las conocí sin interés alguno y con sinceridad me brindaron su amistad que es lo más valioso para mí, siempre me ayudaron a estudiar, lo que no entendí me explicaron y enseñaron. En las buenas y malas han estado conmigo así como en los momentos de tristeza y alegría, por todas las recomendaciones y su manera de ser muchas gracias.

A Silvia, Helena y a todos mis amigos

Por su amistad franca y desinteresada que me han brindado, por los consejos que me dan, por ayudarme cuando más triste me he sentido, por ser tan especiales.

A Maru y Judith

Quienes estudiaban conmigo, de las cuales también aprendí mucho y por la amistad que nos une.

A América, mi amiga del CCH que a pesar de todos los problemas que ha vivido, no se ha olvidado de mí, que siempre me ha aconsejado y me ha demostrado su afecto con honestidad y cariño.

## RECONOCIMIENTOS

A la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer. Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer donde realice mi trabajo de tesis.

A mi director de tesis Dr. Edelmiro Santiago O.

En forma muy especial por haberme permitido colaborar en su grupo de trabajo de laboratorio de investigación, para la realización de mi tesis, por exhortarme, recomendarme, enseñarme y transmitirme sus conocimientos, por su amable paciencia y por cada una de las correcciones realizadas tantas veces como fuera necesario para la terminación de este trabajo.

A mi Asesor de tesis M en C Ángel García S.

Porque sin su ayuda no hubiera realizado mi proyecto de tesis en el laboratorio, por su apoyo en la revisión de la misma y en la parte estadística.

A mis sinodales por sus comentarios y sugerencias

A la Q.F.B. Domitila Burgos

Por todo lo que aprendí de ella durante mi servicio social, y por su amistad brindada.

.

Al M en C Edgar Ledesma quien me instruyo a trabajar en el laboratorio, por la paciencia que tuvo y por todo su apoyo incondicional.

A las Biol. Yolanda Córdova, Laura Muñoz

A los tesisistas Cynthia Bustos, Oswaldo Silvestre, Erika Hernández, Haydee e Itzen por su apoyo en la realización de este trabajo y por haberlos conocido.

A los Profesores que tuve durante toda mi carrera y me enseñaron.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA NACIONAL DE MÉXICO y a La FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA por la formación que me dio y a quién debo lo que soy.

A todos gracias

## INDICE

I.	ABREVIATURAS	1
II.	RESUMEN	2
III.	MARCO TEÓRICO	4
	1.- HEMATOPOYESIS	4
	- Historia y células tallo hematopoyéticas	4
	- Microambiente hematopoyético	9
	- Factores de crecimiento hematopoyético	13
	- Bazo y hematopoyesis	18
	- Leucemia	20
	- Tratamientos actuales	22
	2.- CASEÍNAS Y HEMATOPOYESIS	25
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
V.	JUSTIFICACIÓN	33
VI.	HIPÓTESIS	35
VII.	OBJETIVOS	36
VIII.	MATERIAL Y MÉTODO	37
IX.	RESULTADOS	42
X.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
XI.	CONCLUSIONES	53
	- Perspectivas	53
XII.	DIAGRAMA DE FLUJO	54
XIII.	APÉNDICE	55
XIV.	BIBLIOGRAFÍA	56

## II RESUMEN

La generación de las células de la sangre, evento conocido como hematopoyesis, tiene lugar en la médula ósea sitio donde se localizan las células primitivas hematopoyéticas, las cuales dan origen por multiplicación y diferenciación celular a los diferentes linajes celulares sanguíneos. La hematopoyesis es regulada por una serie de moléculas glicoprotéicas conocidas como factores de crecimiento hematopoyéticas, producidas por las células estromales y las propias células sanguíneas. Recientemente se mostró que la hematopoyesis *in vitro* puede ser regulada por moléculas distintas a los factores de crecimiento hematopoyético, particularmente por el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína, pero se desconoce si conserva esta propiedad *in vivo*.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar si el CasNa activa la hematopoyesis *in vivo*. Se trabajó con grupos de tres ratones BALB/c que recibieron cada dos días durante una semana una inyección de CasNa al 10 % (P/V en agua Milli-Q) o sólo agua Milli-Q como vehículo. Al séptimo día se sacrificaron, se obtuvieron las células de médula ósea, se pasaron por un gradiente de densidad para obtener células mononucleadas las cuales fueron cultivadas en presencia o ausencia de IL-3, al día cinco de cultivo se adicionó timidina tritiada y al sexto se cosechó y evaluó la incorporación de tritio. También se extrajeron los bazo, se pesaron y se les tomo fotografías.

Los resultados permitieron observar que los ratones tratados con CasNa presentaron un bazo (órgano hematopoyético extramedular) más grande y mayor número de células mononucleadas obtenidas de médula ósea. Finalmente, se encontró que las células mononucleadas provenientes de ratones inyectados con CasNa mostraron mayor potencial de proliferación utilizando como análisis estadístico la prueba de ANOVA y t-Student.

#### 1.- HEMATOPOYESIS

##### **Historia y células tallo hematopoyéticas**

Uno de los primeros investigadores en indagar sobre las células precursoras fue Maximov quien en 1923 formuló la noción sobre las células progenitoras de la sangre y consideró que por su morfología estas células se parecían a los linfocitos y por tal motivo no podían ser reconocidas fácilmente en la médula ósea.<sup>1</sup>

La existencia de las células tallo hematopoyéticas fue evidenciada por Till y McCulloch, cuando descubrieron que se evitaba la muerte de ratones irradiados letalmente mediante la inyección de células de médula ósea normal.<sup>2</sup>

Tras la inyección de células normales se presentaban focos de alta tasa de proliferación localizadas en el bazo de los ratones recuperados, cada foco de crecimiento contenía células en diferente grado de maduración, estos eran de tipo granulocito, monocito o eritrocito, y lo más interesante es que formaban focos de proliferación constituida por una mezcla de estos tipos celulares incluyendo a los linfocitos. Cada foco de células en crecimiento provino de la multiplicación de una sola célula precursora, la proliferación de varias de ellas fue lo que constituyó el tejido hematopoyético de los ratones transplantados.<sup>3</sup> Lo anterior les permitió concluir que el bazo es el sitio de residencia para las células pluripotenciales o tallo, inyectadas de ratones sanos después de 7 a 14 días de transplante, de aquí que las células progenitoras de estas colonias tengan el término de unidades

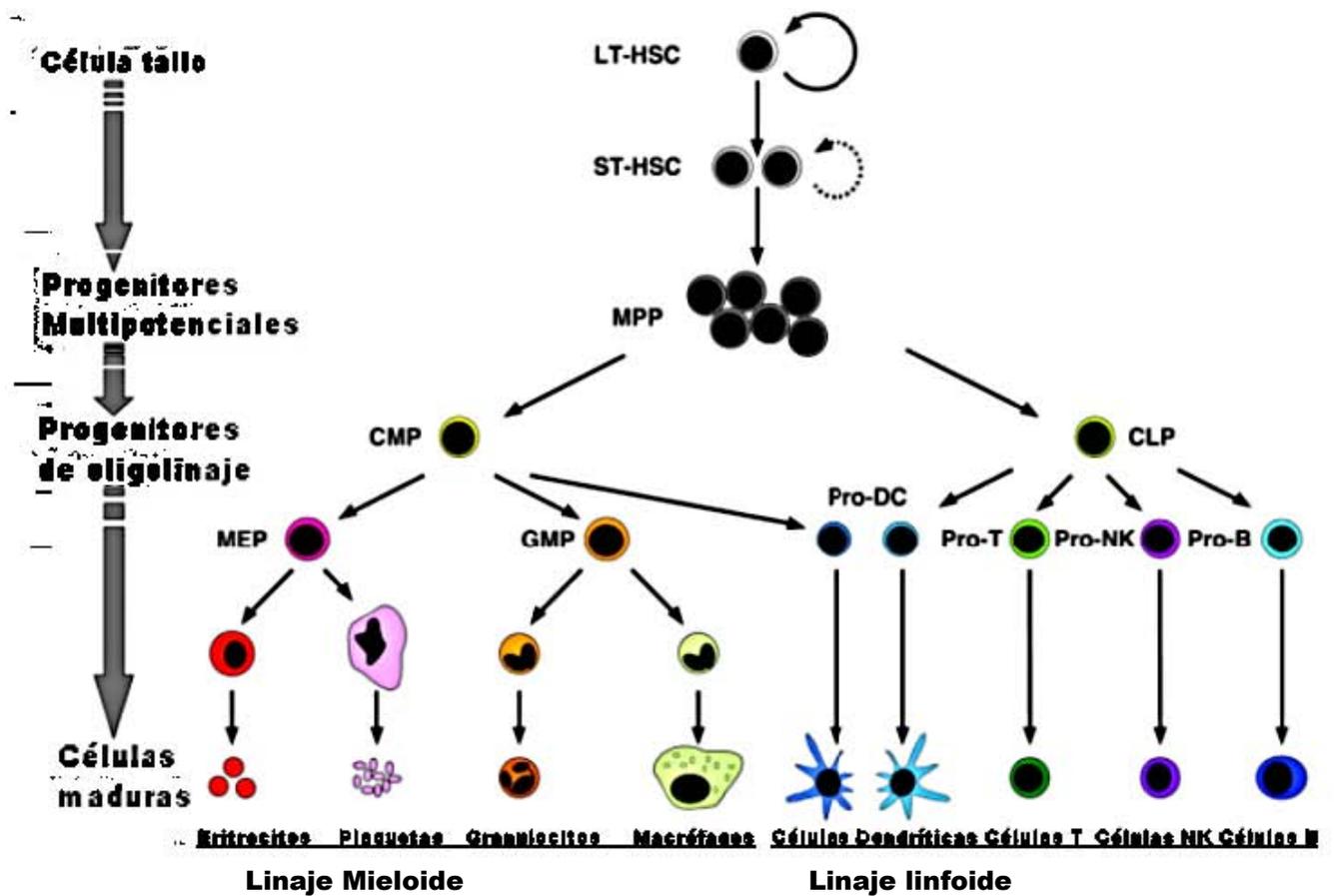
formadoras de colonias del bazo (CFU-S del Inglés “colony forming unit-spleen”).<sup>4</sup>

Los cultivos *in vitro* de células de médula ósea de ratón por 7 días, también desarrollaron colonias de células hematopoyéticas, lo que confirmó la presencia de las CFU-S.<sup>5</sup> Fue así como se concluyó que en la médula ósea existen células hematopoyéticas con la capacidad de reconstituir la hematopoyesis en individuos inmunodeficientes.

Los focos de proliferación compuestos de células de tipo granulocito, monocito, etc., y la formación de focos de proliferación con composición celular mixta, indican la existencia de células precursoras monopotenciales y multipotenciales o pluripotenciales. Las CFU-S multipotenciales fueron consideradas como las células precursoras hematopoyéticas más primitivas a las cuales se les llamó células tallo hematopoyéticas (HSC del Inglés “hematopoietic stem cells”) y se les definió como células con capacidad de autorrenovación, alto potencial proliferativo y capacidad para diferenciarse a todos los linajes hematopoyéticos.<sup>6</sup> Las HSC han sido divididas en dos subgrupos de acuerdo a estudios de trasplante en modelos de ratón, las reconstituyentes a largo plazo y las de corto plazo. Las primeras HSCs (LT-HSC por sus siglas en Inglés, long-term hematopoietic stem cells) representan 0.007% en el ratón,<sup>7</sup> y son capaces de autorrenovarse indefinidamente y reconstituyen la hematopoyesis para toda la vida; las segundas HSCs (ST-HSC por sus siglas en Inglés, short-term hematopoietic stem cells) que retienen la capacidad de auto-renovación y reconstitución de la hematopoyesis y sólo pueden autorrenovarse por un periodo de seis a ocho semanas,<sup>8</sup> y dan lugar

a los progenitores multipotenciales (MPP "multipotent progenitors"), los cuales se diferencian hacia progenitores restringidos de oligolinaje, originando directamente todos los linajes sanguíneos y pueden autorrenovarse por un periodo menor a dos semanas. Por lo tanto, una posible jerarquización de las células pluripotenciales quedaría así LT-HSC --- ST-HSC ---MPP.<sup>10, 11</sup>

Se han localizado dos clases de progenitores de oligolinaje restringido en el ratón: los progenitores linfoides comunes (CLP) los cuales están restringidos a nivel clonal para dar origen a los linfocitos T, linfocitos B y células naturales asesinas (NK)<sup>12</sup> y los progenitores mieloides comunes (CMP), estos dan origen al linaje mieloides, como los monocitos/macrófagos, granulocitos y progenitores megacariocito/eritroides los cuales se diferencian hacia megacariocitos/plaquetas y eritrocitos, estos progenitores aún mantienen el potencial para la diferenciación hacia el linaje de células B, pero a una frecuencia extremadamente baja.<sup>13</sup> Algo interesante es que ambas clases de progenitores pueden generar células dendríticas, sugiriendo con esto la existencia de vías alternas para la generación de este grupo de células (Figura 1).<sup>8,14,15,</sup>



### LINAJE MIELOIDE

### LINAJE LINFOIDE

**FIGURA 1.** Esquema de células de progenitores de linaje y la hematopoyesis. La HSCs se dividen en LT-HSC, células tallo hematopoyéticas de largo plazo y ST-HSC de corto plazo; a su vez se diferencian en MPP, progenitores multipotenciales; estos dan origen a las CLPs (progenitores linfoides comunes) que desarrollan Linfocitos T, B y NK (células naturales asesinas). Las CMPs (progenitores mieloideos comunes) desarrollan GMPs (progenitores granulocito-macrófagos) para diferenciarse en granulocitos, macrófagos, monocitos; y en MEP (progenitores megacariocito-eritroides) que produce eritrocitos, plaquetas y megacariocitos. Ambos CLPs y CMPs desarrollan células dendríticas.<sup>8</sup>

En humano se han identificado a las células por medio de anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie. Estos marcadores permiten enriquecer la población de células seminales, lo innegable es que las células primitivas hematopoyéticas altamente purificadas provenientes del saco vitelino,

hígado fetal, bazo o de médula ósea tienen el potencial de repoblar el tejido hematopoyético.<sup>16</sup>

La diferenciación celular es un fenómeno en el cual existen cambios fenotípicos y se adaptan nuevas características funcionales. La hematopoyesis (haima = sangre y poyesis = producción) es el proceso por el cual se da la formación de células sanguíneas mieloides y linfoides funcionales. Este proceso se inicia desde la embriogénesis en el saco vitelino, posteriormente migra a hígado y bazo, finalmente llega a la médula ósea sitio definitivo de la hematopoyesis en la vida adulta.<sup>17</sup>

El sistema hematopoyético se compone de tres compartimientos:

- 1) el primitivo conformado por las células más primitivas o totipotenciales
- 2) el progenitor conformado por células comprometidas a un linaje maduro específico
- 3) el maduro compuesto de todas las células maduras de la sangre como son los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, eritrocitos y linfocitos T y B.<sup>18</sup>

El paso de una población a otra es una trayectoria irreversible, en la que las células incrementan su número y sufren comprometimiento hacia un linaje específico, pero progresivamente disminuyen su potencialidad y su capacidad de autorrenovación.<sup>19, 20</sup>

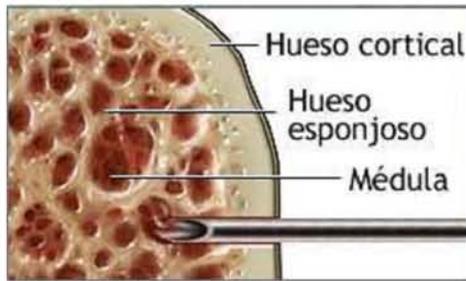
Existen dos hipótesis para explicar como ocurre la autorrenovación o

comprometimiento (diferenciación) de una célula tallo. El modelo determinístico establece que no cualquier célula seminal sufre un comprometimiento, ya que estas son influenciadas por factores microambientales que las comprometen irreversiblemente a cierto linaje celular. El modelo estocástico menciona que cualquier célula seminal tiene la misma probabilidad de sufrir autorrenovación, o entrar al compartimiento de comprometimiento, las citocinas solo facilitan la progresión de estos eventos.<sup>21</sup>

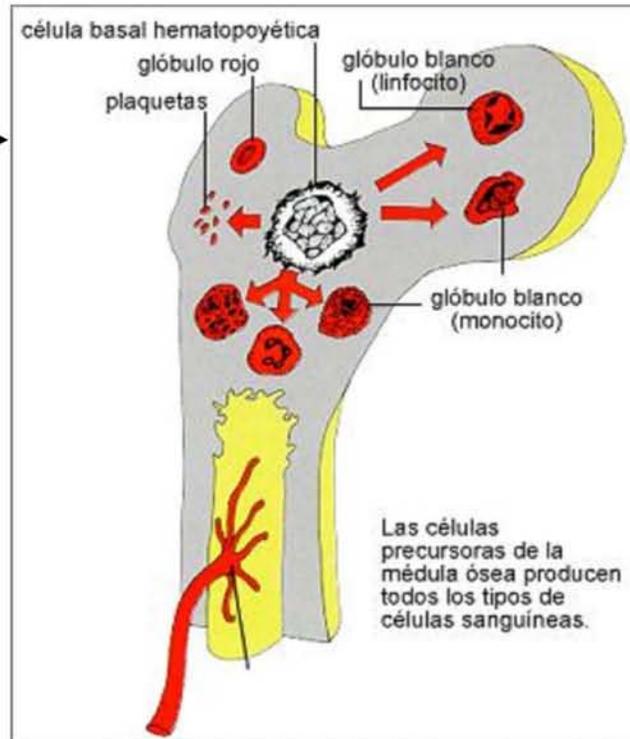
### **Microambiente hematopoyético**

Las células hematopoyéticas precursoras, se localizan en el estroma de la médula ósea, dentro del tejido esponjoso del hueso, este se encuentra rodeado por el hueso cortical<sup>12, 22, 23</sup> (Figura 2). Las células tallo hematopoyéticas (HSCs) son células pluripotenciales, es decir tienen la capacidad de originar todos los linajes sanguíneos, y representan menos del 0.01% de células mononucleadas en la médula ósea. Fenotípicamente, son células pequeñas con poco citoplasma,<sup>24</sup> en condiciones normales la mayoría de las HSCs se encuentran quiescentes (fase Go del ciclo celular) y solo se dividen para mantener los niveles de la hematopoyesis en el organismo.<sup>25</sup>

En la médula ósea se localizan distintos tipos de células estromales, tales como fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipositos quienes son los encargados de producir citocinas y crear el microambiente propicio para la hematopoyesis.<sup>17</sup>



**FIGURA 2.** En el hueso esponjoso (A) se localiza la médula ósea (B) donde se encuentran las células que dan origen a los diferentes linajes tanto mieloide (plaquetas, granulocitos, macrófagos, eritrocitos) como linfoide (células dendríticas, células T, células NK, células B). 22,23



Las células progenitoras hematopoyéticas (CPHs) derivadas de las HSCs pierden su capacidad de auto-renovación y pluripotencialidad, pero adquieren la suficiente capacidad proliferativa para generar las células sanguíneas maduras requeridas. Las células comprometidas hacia determinado linaje también conocidas como unidades formadoras de colonias (CFU) pueden ser de granulocitos (CFU-G), eritrocitos (CFU-E), megacariocitos (CFU-MK), granulocito-macrófagos (CFU-GM), células B (CFU-preB), etc., son células que darán origen a las progenitoras maduras, dependiendo del linaje al que pertenecen. 12,26

En las etapas finales, las células han sufrido una dramática especialización promovida por la entrada a la fase de diferenciación. En estas etapas los distintos precursores pueden ser identificados mediante tinciones morfológicas y además,

existe una notable o total disminución en su capacidad proliferativa.<sup>27</sup> Al madurar los precursores dan origen a las células sanguíneas circulantes. Este compartimiento contiene varios tipos de células completamente distintas en apariencia y con funciones específicas.<sup>28</sup> Las células que pertenecen al linaje linfoide originarán a las células B, T y naturales asesinas, cuya función es participar en la respuesta inmune; mientras que en el linaje mieloide generarán a los eritrocitos, que se encargan fundamentalmente del transporte de oxígeno; las plaquetas que participan en la coagulación sanguínea; los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y monocitos, quienes también intervienen en la respuesta inmune de la defensa del organismo contra agentes extraños, ya sean exógenas (bacterias, hongos, virus, etc) o endógenas (células tumorales, etc) (Figura 1).<sup>29</sup>

Las células precursoras hematopoyéticas tienen períodos de vida relativamente cortos desde unas horas como los granulocitos o hasta varias semanas como los eritrocitos, de forma tal que diariamente mueren y se originan grandes cantidades de estas células.<sup>17</sup> La actividad hematopoyética se inicia en el saco vitelino donde un grupo de células origina a las precursoras totipotenciales o también denominadas madre, las cuales son transportadas a diferentes órganos como el hígado, bazo, timo y médula ósea para dar lugar enseguida a la proliferación y diferenciación de todos los linajes celulares que forman la sangre.<sup>30</sup>

Las células hematopoyéticas, en las primeras semanas de desarrollo en el saco vitelino, bazo e hígado fetal, son principalmente eritroblastos y mielocitos. En el

timo, la porción epitelial comienza a poblarse de células precursoras linfoides que se diferencian posteriormente hasta linfocitos del timo donde proliferan en número dando lugar a linfocitos T. A partir de las células totipotenciales en la médula ósea se comienzan a desarrollar todos los tipos celulares de la sangre al igual que el tejido conjuntivo, de tal manera que el principal sitio de actividad hematopoyética de la vida postnatal donde se forman tanto las células de linaje mieloide y linfoide que circulan en la sangre periférica es la médula ósea ya que otros órganos o centros hematopoyéticos dejan de ser funcionales.<sup>31</sup>

Se considera que las células precursoras del linaje linfoide y mieloide; y la matriz extracelular constituyen el nicho indispensable para la sobrevivencia, autorreplicación y comprometimiento de las células HSC hacia los diferentes linajes hematopoyéticos.<sup>32, 33</sup>

Las células tallo representan 0.01-0.005% de todas las células presentes en la médula ósea; se ha estimado que en humanos normales hay aproximadamente 50 millones de HSC, las cuales pueden producir hasta  $1 \times 10^{13}$  células sanguíneas maduras en un intervalo de vida normal. Sin embargo en situaciones como sangrado o infección ocurren varios eventos; los depósitos de células hematopoyéticas en la médula ósea o adheridas al endotelio son rápidamente liberadas a la circulación, y son localizadas en el sitio de daño, pocos progenitores y células maduras sufren apoptosis, además las HSCs y progenitores son estimulados a proliferar y a diferenciarse a leucocitos, eritrocitos y plaquetas. Cuando el sangrado, infección u otro tipo de estrés cesa, la demanda de células sanguíneas disminuye, los procesos anti-apoptóticos y proliferativos caen, las células sanguíneas son redistribuidas

a sus sitios de almacenamiento, y la cinética de la hematopoyesis retorna a sus niveles basales. Este proceso se repite innumerable veces durante nuestras vidas.<sup>29, 34, 35, 36, 37</sup>

### **Factores de crecimiento hematopoyético**

La diferenciación de las células progenitoras hacia células especializadas es controlada por factores glicoproteicos producidos en la médula ósea.<sup>38</sup>

Conclusión obtenida por experimentos de cultivos *in vitro* de células precursoras hematopoyéticas provenientes de médula ósea de ratón, éstas sólo proliferan en presencia de células estromales o medio condicionado de estas mismas.<sup>39,40</sup>

Los factores obtenidos de los diferentes tipos celulares, mostraron mayor actividad sobre un linaje en particular; el factor proveniente de medio condicionado de fibroblastos induce la formación de colonias de monocito-macrófago. El de macrófago induce la formación de colonias de granulocitos, y el de epitelio induce la formación de colonias de granulocito-macrófago,<sup>41</sup> que en conjunto se les denomina factores de crecimiento hematopoyético o factores estimuladores de colonias (CSF) y son miembros de la familia de las citocinas.

Los CSF interactúan en las poblaciones de células inmunes inmaduras potenciando su maduración y proliferación a través de la unión a receptores específicos de membrana.<sup>42</sup> Estas moléculas presentan retro-regulaciones positivas y negativas entre sí y por lo general no actúan solas sino con otras citocinas, producidas por la misma célula pudiendo inducir, potenciar o inhibir la

producción de citocinas y modular negativamente o positivamente los efectos de dichas citocinas.<sup>40</sup>

Esto ha permitido establecer que la hematopoyesis se sostiene debido a que las células integrantes del estroma secretan diversas citocinas tales como interleucinas (IL) (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-7, IL-10, IL-13 entre otras), factores estimuladores de colonias (CSF) ya sea de tipo granulocito-macrófago (GM-CSF) o de macrófago (M-CSF) o de granulocito (G-CSF) así como el factor de células tallo (SCF) factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento transformante (TGF) e incluso hasta antagonistas de algunas citocinas como el IL-1Ra.<sup>43</sup>

Las células en su estado más primitivo requieren de la acción concertada del SCF que tiene efecto positivo para la sobrevivencia y proliferación de las células seminales. Para las células progenitoras, solo la presencia de factores como IL-3 es suficiente para su proliferación y diferenciación hacia células maduras. Por otro lado, la regulación negativa de la hematopoyesis está bajo el control de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interferón gama (IFN $\gamma$ ), factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ), IL-4, IL-10 e IL-13.<sup>34</sup>

La clonación de células hematopoyéticas sustentada por los CSF, la identificación y clonación de estos genes así como de sus receptores y la producción de citocinas recombinantes ha permitido la caracterización de éstos y otros factores que inducen la proliferación y diferenciación de las células precursoras

comprometidas e incluso de células tallo pluripotenciales, también de aquellos que regulan de manera negativa la proliferación, actualmente se conocen más de treinta factores<sup>42</sup> (Tabla 1).

**TABLA 1 – Citocinas hematopoyéticas<sup>42</sup>**

Citocina	Peso Molecular (Kd)	Origen	Principales efectos
<b>INTERLEUCINAS</b>			
IL1- $\alpha$ IL-1 $\beta$	15-17	Monocitos-Macrófagos	Fiebre (pirógeno endógeno), sueño, anorexia, inflamación, expresión de CD 54 en las células endoteliales y liberación del factor tisular, activación linfocitaria, producción de IL-6 Y CSF.
IL-2	15-15	Células T	Induce la proliferación de la célula T, coestimula la proliferación y diferenciación de la célula B.
IL-3	14-28	Células T, Mastocitos,	Potencia a las NK y LAK (agresoras activadas por linfocinas) y la proliferación de distintos linajes celulares: eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos, granulocitos, y monocitos.
IL-4	20	Células T, Mastocitos	Induce la proliferación del mastocito, proliferación de la célula hematopoyética pluripotencial
IL-5	45	Células T, Mastocitos	Induce la proliferación de la célula T y la generación de LTC, coestimula la proliferación de la célula B, sinergiza con la IL-3 en la proliferación del mastocito, estimula la producción de Ig E e Ig G 4, induce la expresión y liberación de CD 23, la clase II del CMH en la células B, cambia de $T_H$ a $T_H2$ .
IL-6	23-30	Monocitos, Fibroblastos	Induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de Ig A
IL-7	25	Células de la médula ósea y del estroma tímico	Pirógena, induce la proliferación de plasmocitomas e hibridomas, aumenta la producción de Ig, la clase I en los fibroblastos, acción con la IL-2 en la producción de Proteínas de Fase Aguda por lo hepatocitos, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de la célula hematopoyética, induce la diferenciación del LTC. Induce la proliferación de las células pro y pre B de los linfocitos inmaduros
IL-8 (quimiocina)	6.5	Monocitos, células endoteliales, macrófagos alveolares, fibroblastos.	Induce la quimiotaxis y activación de neutrófilos y células T.

IL-9	30-40	Linfocitos Th	Activa la proliferación de Th
IL-10	17-21	Células T	Induce la proliferación de algunas células T, potencia la proliferación del mastocito inducida por la IL-3.
IL-11	24	Células T, células B activadas y monocitos.	Inhíbe la activación del MAC, estimula la producción de célula B y la producción de Ac, estimula los mastocitos y cambia de $T_H$ a $T_{H2}$ .
IL-12	75	Células del microambiente hematopoyético	Estimula la producción de Ac, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de megacariocitos, estimula los progenitores del macrófago.
IL-13	10	Monocitos, macrófagos, algunas células B y mastocitos.	Activa a las NK para secretar IFN-gamma, cambia $T_H$ a $T_{H1}$ , inhibe la producción de Ig E inducida por la IL-4.
IL-14	?	Células T	Induce la proliferación y diferenciación de células B e inhibe la producción de IL-1.
IL-15	14-15	Células B y macrófagos	Induce la secreción de Ig E.
IL-16	56	Células T	Induce la proliferación de la célula B
IL-17	20-30	Células no linfoides, musculares	Induce la proliferación y citotoxicidad de las células de las NK, diferenciación de la célula NK.
IL-18	?	Células endoteliales y monocitos.	Inmunomodulatoria.
<b>INTERFERONES</b>			
IFN- $\alpha$	18-20	Linfocitos	Coestimula la producción de la célula T, induce la secreción de la IL-6, IL-8 y G-CSF a partir de las células endoteliales, epiteliales y fibroblástica.
IFN- $\beta$	20	Fibroblastos y células amnióticas	Incrementa la expresión de antígenos de clase I y II HLA. Y la actividad de células NK. Induce el factor Inductor del IFN-gamma similar a la IL-1.
IFN- $\gamma$	20-25	Linfocitos CD 4+ y CD 8+, células NK y Th 1.	Posee efectos antivirales e inmunomodulatorios. Es quimiotáctico para monolitos y aumenta en ellos la expresión de HLA clase I.
<b>FACTORES DE NECROSIS TUMORAL (TNF)</b>			
TNF- $\alpha$ (caquectina)	17	Fibroblastos, células NK, neutrófilos, astrositos, células endoteliales y células del músculo liso.	Proinflamatorio, antitumoral. Agente neovascularizante y estimulante de la resorción ósea.
TNF- $\beta$ (linfotóxina)	25	Linfocitos T	Idem anterior.
<b>FACTORES ESTIMULANTES DE COLONIAS (CSF)</b>			

GM-CSF	14-35	Células T, endoteliales, macrófagos, y fibroblastos	Estimulación de proliferación y diferenciación de precursores mieloideos, potencia las funciones de neutrófilos y monocitos maduros (lisis y fagocitosis)
G-CSF	18-22	Monocitos-macrófagos, células endoteliales, células T, neutrófilos y fibroblastos.	Estimula la proliferación y diferenciación de la línea de granulocitos neutrófilos. Estimula la actividad de PMN maduros.
M-CSF	70-90	Monocitos-macrófagos, células endoteliales y fibroblastos.	Estimulación de diferenciación de precursores hemopoyéticos, hacia la línea monocítica. Funcionalidad de monocitos y macrófagos maduros.
Eritropoyetina	30	Células intersticiales peritubulares renales, hígado y macrófagos de médula ósea.	Regula la producción de eritrocitos en condiciones normales y recuperación post anémica.
Trombopoyetina	18-70	Hígado, riñón y músculo liso. En menor proporción en bazo y células stem.	Estimula la proliferación y la diferenciación de las células progenitoras megacariocíticas. Aumenta la producción plaquetaria.

### FACTORES ESTIMULADORES DEL CRECIMIENTO

PDGF		Plaquetas	Activa la activación plaquetaria, principalmente actúa regulando mecanismos de adherencia.
TGF- $\alpha$	may-20	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales	Induce la proliferación de los progenitores de los granulocitos y de los monocitos, activa a los macrófagos, aumenta producción de Leucotrienos en el eosinófilo, actividad tumoricida del monocito. Induce la proliferación del granulocito.
TGF- $\beta$	25	Monocitos, fibroblastos y células endoteliales	Induce la proliferación de monocitos
FGF		Tejido conectivo	Proliferación de fibroblastos, síntesis de colágena y macromoléculas de matriz intersticial
EGF		Células de lámina basal epidermal	Crecimiento y diferenciación de epitelios
ILGF-1	55-70	Hígado y células del sincitiotrofoblasto respectivamente	Promueve proliferación y diferenciación de múltiples tejidos contribuyendo al desarrollo corporal postnatal y embrionario.
ILGF-2			

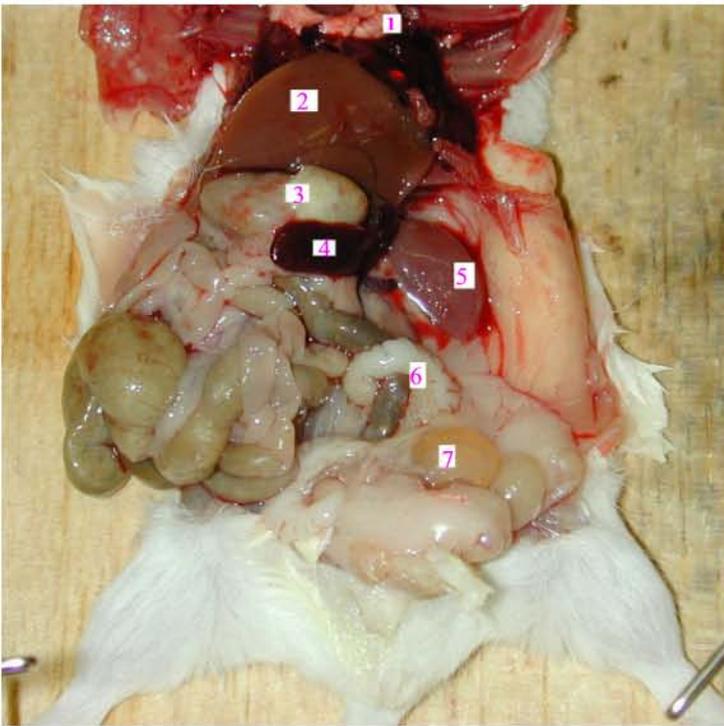
### QUIMIOCINAS

C (carece del primer y tercer residuo cisteína conservados) Ej: LINFOTAXINA (LPTN)	Variable	Plaqueta, placenta, riñón, hueso, células T y B.	Induce la angiogénesis, la proliferación de los queratinocitos, la resorción ósea y la proliferación tumoral.
C-C varios ej: MIP-1a, RANTES, MIP-1b, EOTAXINAS, MCP-1 Y MCP-3	Variable	CD8 activados, mastocitos	Induce la quimiotaxis de las células T y NK
CXC (varios ej: IL-18, IP-10, SDF.	Variable		Induce la quimiotaxis de las células T, NK, basófilos y eosinófilos.

## **Bazo y hematopoyesis**

La médula ósea es el órgano hematopoyético primario que reúne todas las características y cuenta con el microambiente necesario para la producción de células sanguíneas en la etapa adulta,<sup>44</sup> sin embargo el bazo juega un papel muy importante en la hematopoyesis secundaria, que puede ser fundamental.<sup>45</sup> Se ha determinado que participa de manera determinante en la reconstitución hematopoyética de ratones letalmente irradiados.<sup>1</sup> También se ha encontrado que las células que forman colonias en bazo tienen el espectro completo de células mieloides,<sup>46,47</sup> esto se confirmó por el hallazgo de células hematopoyéticas primitivas en este órgano. La hematopoyesis extramedular en los órganos hematopoyéticos en particular bazo, refleja la propiedad de las células hematopoyéticas inertes de volverse activas si son estimuladas.<sup>48</sup> Entonces el bazo es un órgano que puede participar de manera activa en la hematopoyesis llegando incluso a suplir las funciones de la médula ósea.<sup>32</sup>

El bazo se ubica en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, bajo el diafragma y a la izquierda del estómago<sup>49, 50</sup> (figura 3). Éste se desarrolla a partir de las células mesodérmicas situadas entre las hojas del gástrico dorsal.<sup>51</sup>



- 1.- Pulmón
- 2.- Hígado
- 3.- Estómago
- 4.- **Bazo**
- 5.- Riñón
- 6.- Vesícula seminal
- 7.- Vejiga

**Figura 3.** Anatomía y ubicación del bazo (4) de ratón.<sup>50</sup>

El bazo, envuelto en una cápsula de tejido conectivo, contiene el mayor cúmulo de linfocitos y fagocitos mononucleares en el cuerpo. Estas células junto con una red reticular, están concentradas en diferentes áreas del bazo y contribuyen a la

formación de los siguientes tres tipos de pulpa (tejido dentro de la cápsula): blanca, roja y zona marginal. La imagen dentada del órgano (hilio) es donde los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y los nervios penetran en la pulpa. El tejido conectivo que se extiende dentro del órgano desde la cápsula (trabéculas) divide a la pulpa en compartimentos comunicantes.

El parénquima se compone de la pulpa roja y la pulpa blanca.<sup>52</sup> La pulpa blanca (linfocitos primarios), una zona blanco grisáceo visible, está formada por los nódulos linfáticos y la vaina linfática periarterial. Dentro de los nódulos existen centros germinales que consisten en una mezcla de linfocitos B, células reticulares y macrófagos fagocíticos. La rama linfática periarterial rodea a las arterias en el momento en que entran. Esta vaina se encuentra repleta de linfocitos T y macrófagos. Se localiza donde inicia la respuesta inmune, en algunos casos de la actividad inmunitaria aumentada, podría ocupar hasta la mitad del volumen del órgano (normalmente forma 20%, o menos). La pulpa blanca está rodeada por una zona marginal, una red reticular que contiene vasos sanguíneos, células libres e intersticios estrechos. Esta zona se encuentra en la unión de la pulpa blanca y la pulpa roja, ésta última contiene los senos y los cordones; los senos son espacios vasculares dilatados para la sangre venosa. El color de la pulpa roja se debe a la presencia de sangre en los senos, los cordones están compuestos por cúmulo de tejido reticular y macrófagos, los cuales se localizan entre los senos.<sup>53</sup> En los centros germinales se inicia la respuesta inmunitaria, en donde además de los linfocitos B y T, también se encuentran células NK, granulocitos<sup>54</sup> y células dendríticas.<sup>55</sup>

## Leucemia

La hematopoyesis anormal ocasiona cuadros clínicos que pueden ser letales como la leucemia, ésta es una enfermedad mortal que se caracteriza por proliferación maligna de las células de la sangre y de la médula ósea, donde se bloquea su maduración. Existen dos tipos de leucemia, la leucemia aguda (LA) y la leucemia crónica (LC).<sup>56</sup>

La LA es una enfermedad maligna de la células pluripotenciales mieloides que inicia en la médula ósea e incluye un grupo heterogéneo de desordenes hematológicos caracterizados por la clonación de una sola célula de todas las células mieloides que existen en la médula ósea. El incremento descontrolado de la línea afectada condiciona la acumulación de un tipo celular predominante que suprime e inhibe la producción y maduración hematopoyética normal, lo que favorece en buena parte las manifestaciones clínicas con que batallan los enfermos.<sup>57</sup> La LC es una enfermedad que se presenta en la edad madura, sobre todo de la mitad de la vida en adelante.<sup>56</sup> Las leucemias crónicas de importancia en México son tres: granulocítica, linfocítica y de las células peludas o tricoleucemia; su curso indolente, larga evolución y ausencia de células muy indiferenciadas las distinguen de las leucemias agudas.

La letalidad media anual de las leucemias agudas es de tres a cinco casos por cada 100,000 habitantes y hay una tendencia notable al aumento del padecimiento. En los niños, las leucemias agudas son la causa más frecuente de muerte por neoplasia.

La leucemia granulocítica crónica es menos común en México que la leucemia aguda, pero es más frecuente que la leucemia linfocítica crónica, se puede observar a cualquier edad, pero en niños constituye 3% de las leucemias en general; su frecuencia aumenta gradualmente y predomina en adultos entre los 40-50 años. Se observa más en varones que en mujeres, con una relación de tres a dos.

En la leucemia linfocítica crónica la enfermedad aparece de manera típica en individuos mayores de 50 años, es rara en extremo en adultos menores de 35 años. Mientras que la leucemia de células peludas es poco frecuente en México y predomina en el norte del país, es la que menos se presenta de las leucemias crónicas.<sup>58</sup>

### **Tratamientos actuales**

Los recursos terapéuticos antineoplásicos tradicionalmente han sido de origen químico, actúan como citostáticos o citotóxicos y son agrupados con base a sus características generales o a su mecanismo de acción en:

- a) agentes alquilantes
- b) antimetabolitos
- c) antibióticos
- d) derivados de plantas

La utilización de agentes antineoplásicos tanto químicos como de otra naturaleza, han estado orientados a la supresión o por lo menos a intentar producir remisión de la clona maligna, aunque se ha observado que existe la posibilidad de que en un bajo porcentaje de las células que conforman la línea afectada, desarrollan resistencia contra tales productos, lo cual conduce a fracasos terapéuticos.<sup>57</sup>

Una molécula que ha llamado poderosamente la atención es el derivado del ácido retinoico el ATRA, el cual tiene gran éxito en la terapia de leucemias promielocíticas agudas ya que además de inhibir la proliferación e inducir diferenciación de células malignas *in vitro*, ha demostrado inducir una remisión completa en pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA). Su acción, en una variedad de tipos celulares, es mediada por la interacción con su receptor nuclear, conocido como receptor de ácido retinoico (RAR). Estos receptores tienen sitios de unión de alta afinidad al ATRA y en algunos de sus metabolitos. A pesar de que el ATRA induce una remisión completa en el 85% de los pacientes con LPA, existen dos limitaciones clínicas:

1.- Comúnmente del 5% al 25% de los pacientes sufren el síndrome del ácido retinoico, que causa una progresiva toxemia y fallas multiorgánicas.

2.- La mayoría sufre una recaída con resistencia al tratamiento con ATRA.<sup>59</sup> Se ha propuesto que esta recaída puede ser consecuencia de un incremento en los niveles de citocromo P-450 el cual impide mantener los niveles necesarios de ATRA en el plasma, necesarios para su actividad.<sup>60</sup>

Desde el uso inicial de la quimioterapia, la dosis, el modo de administración y otras variables han permitido lograr mejores resultados, sin embargo, pese al seguimiento de protocolos probados en largas series de pacientes, continúan presentándose casos de resistencia a la quimioterapia, así como susceptibilidad a infecciones debido a la neutropenia que experimenta el paciente por los efectos mielotóxicos de la quimioterapia.

Para las leucemias crónicas las modalidades terapéuticas son variadas pero los agentes alquilantes como el Cloranbucil y la ciclofosfamida son las drogas más frecuentemente empleadas y su dosificación se basa en pequeñas dosis continuas o bien grandes dosis intermitentes, en ambos casos el monitoreo del efecto citotóxico es necesario. Otros agentes como la fluorarabina actúan como inhibidores de la adenosil diamidasa y bloquean la síntesis de DNA “ácido desoxirribonucleico”. De manera experimental se ha empleado la radiación extracorpórea de la sangre, la irradiación mediastinal, la radiación corporal total o la administración de isótopos radiactivos. Desgraciadamente estos recursos son altamente tóxicos y poco efectivos.

Los recursos terapéuticos continúan implementándose y experimentándose. Los análogos de bases púricas como adenosin diamidasa o la 2'- deoxicoformicina (este último es un derivado de cultivos de *Streptomyces antibioticus*) cuando se aplican conjuntamente con el interferón logran hasta un 82% de respuesta completa. El tratamiento para pacientes con leucemia así como el de otros trastornos linfoproliferativos están en continua evolución, las combinaciones de los agentes conocidos, los nuevos medicamentos, los esquemas de aplicación, la vía de administración y aún la cronobiología conforman toda una gama de variantes tendientes a eliminar o a controlar a la clona maligna.

Aunque clínicamente se establezca que existe una remisión completa, desde el punto de vista biológico esto no puede ser aceptado, se ha establecido que después de cada esquema terapéutico se considera que la población destruida es del 99%, posteriormente 99.9% y finalmente 99.99%, de manera que calculando

la probabilidad de supervivencia de las células malignas estas serian de 1%, 0.1% y 0.01% respectivamente. De este conocimiento se desprende la necesidad de administrar terapia de consolidación y aun así no se puede establecer que exista una remisión biológica por lo que se deben emprender estudios orientados a esta enfermedad.<sup>57</sup>

## **2.-CASEÍNAS Y HEMATOPOYÉSIS**

Dentro del campo de la investigación biomédica se ha observado que existen biomoléculas de origen y naturaleza distintas a las citocinas que afectan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, como por ejemplo el ácido retinóico (ATRA), miembro de la familia de las hormonas esteroideas y la caseína (proteína más abundante de la leche), sustancia que se encuentra fuera del organismo, la cual actúa de manera similar a las citocinas. En la hematopoyesis algunos datos indican que la sal de caseína, el caseinato de sodio (CasNa), aumenta la diferenciación de la línea celular hematopoyética de ratón 32D,<sup>61</sup> por lo que en el proceso de la hematopoyesis y en la respuesta inmune el consumo de leche es muy importante e indispensable en el organismo.<sup>62,63</sup>

La leche y los productos lácteos son componentes importantes en la dieta humana. A nivel mundial, contribuyen con cerca del 4% de la energía total del cuerpo, y en algunas zonas geográficas como Norte América, Australia y Europa su contribución es hasta del 10% (FAO 1995-1999). Aunque existe una considerable variación geográfica con la de otras especies, la leche de vaca es la

más frecuentemente consumida.<sup>64</sup> La leche es un complejo nutricional que contiene más de cien sustancias disueltas en agua, la leche bovina 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 (Tabla 2). La caseína, la principal proteína presente en la leche se encuentra dispersa en un gran número de partículas en suspensión coloidal que se conocen como micelas.<sup>65</sup> La concentración de proteína de la leche varía de un 3.0-4.0%, el cual está compuesto entre un 76-86% por caseínas (30-35g/L).<sup>66,67</sup>

<b>FRACCIÓN PROTEÍCA (3.6%)</b>	<b>%DEL TOTAL DE LA FRACCIÓN</b>
<b>Caseínas</b>	<b>80</b>
Alfa S1	34
Alfa S2	8
Beta	25
Kappa	9
Lambda	4
<b>Proteínas del suero</b>	<b>20</b>
Alfa-lactoalbúmina	4
Beta-lactoglobulina	9
Inmunoglobulinas	1
Proteasas-peptonas	2
<b>GRASAS (4.1%)</b>	<b>%DEL TOTAL DE LA FRACCIÓN</b>
Triglicéridos	95-96%
Diglicéridos	1.26-1.59
Monoglicéridos	0.016-0.038
Glicéridos ceto-ácidos	0.85-1.28
Glicéridos hidroxí-ácidos	0.60-0.78
Ácidos grasos libres	0.10-0.44
Fosfolípidos	0.80-1.00
Esfingolípidos	0.06
Esteroles	0.22-0.41
Colesterol	0.419
Escualeno	0.007

Carotenoides	<0.001
<b>VITAMINAS (&lt;1%)</b>	<b>mg/100 mL</b>
<b>Liposolubles</b>	
A	0.08
B	0.00006
E	0.1
K	0.0005
<b>Hidrosolubles</b>	
B1 (Tiamina)	0.05
B2 (Riboflavina)	0.17
B6 (Pirodoxina)	0.06
B12 (Cianocobalamina)	0.00045
Biotina	0.003
Niacina	0.1
Ác. pantoténico	0.35
Ác. fólico	0.006
C	2.1
<b>MINERALES (&lt;1%)</b>	<b>mg/100mL</b>
Calcio	130
Potasio	140
Magnesio	60
Cloro	12
Fósforo	119
Azufre	30
<b>CARBOHIDRATOS</b>	(5%)
<b>AGUA</b>	(86.5%)

**Tabla 2.** Composición de la leche bovina.<sup>65</sup>

La fracción de la caseína de la leche bovina comprende 4 proteínas  $\alpha_{S1}$ - y  $\alpha_{S2}$ - (que son altamente fosforiladas),  $\beta$ - (más hidrofóbica) y  $\kappa$ -caseína (glicosilada), las cuales existen en una proporción aproximada de 39, 10, 37 y 14%.<sup>68</sup> La  $\kappa$ -caseína se encuentra en la superficie de la micela, mientras que el interior está

compuesta por las fracciones  $\alpha_S$  ( $a_{S1}$ - y  $a_{S2}$ - en una proporción 4:1) que están altamente fosforiladas y la  $\beta$ -caseína que se une a moléculas de fosfato de calcio.<sup>69</sup>

Las micelas de caseínas no sólo incorporan sales de calcio, si no que también presentan gran afinidad por cationes divalentes y trivalentes como el hierro o zinc, debido a sus residuos de serinas que se encuentran fosforilados. Los péptidos que presentan son conocidos como caseinofosfopéptidos (CPP).<sup>68, 69</sup>

Cuando las caseínas son sometidas a proteólisis enzimática y bacteriana, se liberan péptidos bioactivos de cerca de diez aminoácidos, que se conocen como exorfinas ( $\alpha$ -caseína), casomorfina ( $\beta$ -caseínas) y casoxinas ( $\kappa$ -caseína).<sup>70</sup>

Algunos de estos péptidos estimulan el sistema inmune de recién nacidos y dan una mayor resistencia a infecciones virales y bacterianas en adultos, por estimular la producción de fagocitos.<sup>71</sup>

Las  $\beta$ -casomorfina actúan sobre la conducta, proliferación de linfocitos de sangre periférica y en los mecanismos de liberación de histamina por leucocitos.<sup>70</sup> Por otra parte, péptidos derivados de la  $\beta$ -caseína muestran actividad moduladora en la función de macrófagos.<sup>72</sup>

La  $\beta$ -caseína muestra actividad inmunomoduladora, ya que aumenta la producción de anión superóxido por neutrófilos y la proliferación de linfocitos,<sup>73</sup> mientras que la  $\kappa$ -caseína es capaz de actuar en la melanogénesis, ya que tiene

un efecto despigmentador, se sabe que el extremo carboxílico del glicopéptido es quién promueve la proliferación celular e inhibe la actividad de tirosina cinasas en células B16.<sup>74</sup>

En células de la mucosa intestinal de ratón, la  $\alpha$ -caseína y su sal, el caseinato de sodio (CasNa) inducen la liberación de colesciticinina, hormona involucrada en la digestión e incrementan las concentraciones de calcio intracelular.<sup>75,76</sup> El hidrolizado de caseína bovina suprime la proliferación de linfocitos *in vitro*.<sup>77</sup> Por otra parte existen datos que indican que las caseínas poseen actividad antihipertensiva y antibiótica.<sup>78,79</sup>

Una dieta baja en caseínas incrementa la posibilidad de presentar tumores en colon de ratas Wistar,<sup>63</sup> mientras que una dieta rica en caseínas protege contra el desarrollo de cáncer intestinal en ratas<sup>80</sup>. Por otra parte hay estudios que indican que la inyección de caseína en ratas eleva la producción de anticuerpos.<sup>76</sup> Lo anterior muestra que las caseínas pueden regular al sistema inmune.

Cuando se disuelve caseína en hidróxido de sodio, se obtiene el caseinato de sodio (CasNa), una sal compuesta por un 65% de proteínas. Es un polvo blanco sin sabor, ni olor, soluble en agua y por su alto contenido de proteínas es utilizado en la industria alimenticia.<sup>65</sup> Por otro lado se ha demostrado que la inyección de caseinato de sodio (CasNa) en cavidad peritoneal induce la acumulación de granulocitos y macrófagos en ratones y peces.<sup>81,82</sup> También se ha observado que la inyección intraperitoneal de CasNa en ratones, eleva la concentración de

factores estimuladores de colonias tipo granulocitos y macrófagos (G-CSF y M-CSF),<sup>83</sup> en suero y exudado de cavidad peritoneal, asimismo se ha observado la presencia de GM-CSF en suero de ratones.<sup>41</sup>

Se ha mostrado que el CasNa acelera la transición de granulocitos en banda a polimorfonucleares en forma similar al G-CSF, además de inducir la liberación de M-SCF en granulocitos<sup>84</sup>, adicionalmente induce diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D (una línea utilizada como modelo de estudio de hematopoyesis normal) hacia el linaje monocito-macrófago.<sup>61</sup> Interesantemente también frena la proliferación de la línea de células leucémicas mielomonocíticas de ratón WEHI-3<sup>85</sup> y datos recientes de nuestro laboratorio indican que, a diferencia de las células WEHI-3, induce la proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratón normal *in vitro*. Este conjunto de datos permiten concluir que las caseínas regulan la hematopoyesis *in vitro*.

Se ha observado que la eliminación de la caseína en la dieta de ratones, provoca reducción en la generación de leucocitos y una dieta complementada con caseína reduce la mielosupresión.<sup>86</sup> Además experimentos *in vivo* revelan que una dieta baja en caseínas reduce los niveles de eritropoyetina, el mayor regulador fisiológico de la eritropoyesis en suero, asimismo disminuye el número de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E) en bazo,<sup>87</sup> mostrando con esto la gran sensibilidad del bazo para cualquier cambio en los niveles de caseína. También se ha reportado que una dieta libre de caseína provoca una reducción en el peso de los ratones cercano al 24% así como modificaciones al microambiente

hematopoyético debido a alteraciones en la estructura de la matriz extracelular en médula ósea.<sup>88</sup>

Lo anterior sugiere la posibilidad de que el CasNa puede servir como regulador de la hematopoyesis *in vivo*.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Recientemente se demostró en estudios *in vitro* que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína, activa la hematopoyesis normal, pero se desconoce si ésta molécula hace lo mismo *in vivo*. En el presente estudio se analiza si el efecto del CasNa se conserva en la hematopoyesis *in vivo*.

## V. JUSTIFICACIÓN

Los decesos en México debido a tumores malignos ocupan el quinto lugar, entre los tumores malignos, las leucemias (una hematopoyesis anormal) provocan el mayor número de muertes con el 1.2% en 1999, incluso por arriba de los tumores malignos del cuello uterino que representan el 0.4% <sup>89</sup>. En el año 2000, las leucemias fueron la segunda causa de mortalidad en edad escolar (5 a 14 años), con un 13%, esta tendencia se mantuvo en el 2001, ocupando nuevamente el segundo lugar de mortalidad solo después de los accidentes automovilísticos <sup>90</sup>. Por lo anterior es importante, la investigación dentro del campo de la hematología que permita conocer nuevas opciones de regulación de la hematopoyesis normal y evaluar la posibilidad de que estos conocimientos puedan ayudar a encontrar alternativas para solucionar problemas de hematopoyesis anormales como el caso de la leucemia.

Como se sabe, los agentes anti-tumorales empleados en la terapia de pacientes leucémicos eliminan células normales y leucémicas, razón por la cual comprometen la salud del paciente.

El tratamiento ideal es la eliminación de las células neoplásicas, pero no de las normales.

Se ha visto que el CasNa activa la hematopoyesis normal, pero frena la leucémica “*in vitro*”. Si esta característica del CasNa se conserva “*in vivo*”, puede abrir una interesante opción terapéutica para la leucemia.

## **VI. HIPÓTESIS**

Conociendo que la adición del caseinato de sodio (CasNa) al cultivo de células normales de médula ósea de ratón estimula la hematopoyesis *in vitro*, suponemos que la inyección de CasNa a los ratones estimulará la hematopoyesis *in vivo*.

## **VII. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

1. Evaluar si el caseinato de sodio (CasNa) activa la hematopoyesis *in vivo*.

### **Objetivos particulares**

1. Evaluar si existe incremento en el número de células mononucleadas de médula ósea en ratones inyectados con CasNa
2. Evaluar si existe incremento en el tamaño y peso del bazo en ratones tratados con CasNa
3. Estimar si las células mononucleadas provenientes de ratones tratados con CasNa tienen mayor potencial proliferativo.

## VIII. MATERIAL Y MÉTODO

### Equipo y Material

#### Equipo

1. Centrifuga DINAC B-D (Becton Dickinson and Company Persippany NJ)
2. Microscopio óptico (American Optical Corporation)
3. Campana de flujo laminar (Veco. México)
4. Campana de madera con luz ultravioleta
5. Balanza granataria (Ohaus. Florham Park N.J. Capacidad de 2kg "5lb").
6. Balanza analítica (Mettler H54 AR). Con capacidad máxima de 160 gramos
7. Incubadora (Termo Forma Series II, Ohio, USA)
8. Contador de emisión beta (Beckman Ls6500 Multi purpose scintillation counter. USA)

#### Material

1. Micropipetas (20 $\mu$ l, 200 $\mu$ l y 1000 $\mu$ l)
2. Puntas para micropipetas (200 $\mu$ l y 1000 $\mu$ l)
3. Cajas Petri (5 y 10 ml)
4. Tubos cónicos de vidrio y plástico (5 y 10 ml)
5. Tubos Eppendorf (1 y 2 ml)
6. Matraz Erlenmeyer (500 y 1000 ml)

7. Probetas graduadas (500 y 1000 ml)
8. Vasos de precipitados (50, 250 y 500 ml)
9. Placas de 96 pozos (Corning NY, USA)
10. Estuche de disección
11. Hemacitómetro
12. Jeringas de insulina de 1 ml

### Reactivos

1. Colorante azul tripano (Sigma Chem USA)
2. Iscove's Modified Dulbecco's (Gibco BRL, USA)
3. Agua Milli-Q
4. Ficoll-Paque ( $\delta = 1.077\text{g/ml}$ )
5. Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco BRL, USA)
6. Caseinato de sodio (CasNa)
7. Etanol al 70%

### **Método**

#### Preparación del CasNa

El caseinato de sodio (CasNa) (Difco, USA) se utilizó al 10% (p/v) 0.1g (100 mg.) de CasNa disuelto 1 ml (1000  $\mu\text{l}$ ) de agua Milli-Q previamente esterilizado en autoclave por 20 minutos a una temperatura de 120° y 15 lb de presión, al igual que el vehículo (Agua Milli-Q) se trabajó en las mismas condiciones.

## Inyección a los ratones

1. Los ratones se dividieron en tres grupos de dos, al grupo control no se le inyectó, al segundo grupo se le inyectó agua Milli-Q como vehículo y al tercer grupo se le inyectó CasNa.
2. Este tratamiento se realizó cada tercer día por un período de 7 días.

## Obtención de células

3. Después del tratamiento se sacrificaron los tres grupos de ratones por medio de dislocación cervical. Se obtuvieron los fémures y bazos. Esto se realizó en la campana de cultivo, previamente desinfectada con alcohol al 70% y se esterilizó por 20 minutos con luz ultravioleta (UV): los fémures se colocaron en cajas petri con medio Iscove's.
4. Se cortaron las epífisis de cada fémur de los tres grupos evitando que se astillaran y con una jeringa de insulina de 1 ml con medio de Iscove's suplementado con SFB al 10% se extrajeron las células totales de médula ósea. La suspensión celular se centrifugó para obtener el botón celular de cada grupo, la cual se colocó en tubos con 2 ml de medio Iscove's, SFB al 10% y se resuspendieron perfectamente y se colocaron cuidadosamente sobre Ficoll en tubos cónicos y se centrifugaron por 17 minutos a 500g.
5. Al finalizar éste período se obtuvo un anillo celular de cada muestra, el cual contenía a las células mononucleadas, éstas se lavaron dos veces con medio Iscove's y SFB al 10% y finalmente se realizó el conteo directo de células mononucleadas.

### Viabilidad y número celular

6. Se evaluó por medio de la incorporación de azul tripano (Sigma USA), con una dilución 1:1 con colorante azul tripano y se realizó el conteo de células vivas y muertas en el hemocitómetro.

### Placa

7. Posteriormente, las células se cultivaron en placas de 96 pozos, a una densidad inicial de  $2 \times 10^4$  células / mL; dividiendo la placa en tres partes, una parte donde se colocaron las células del grupo control, otra las del vehículo y una última con las de CasNa. Cada variable se repitió en tres pozos, adicionándose además de las células a la segunda y tercer fila de cada grupo IL-3, y sólo a la tercer fila se le adicionó finalmente CasNa, manteniéndose en condiciones de cultivo, al quinto día de cultivo se adicionó  $1 \mu\text{Ci}$  de  $[\beta\text{-}^3\text{H}]$  dTTP timidina.

### Evaluación de la proliferación

8. La proliferación de las células de médula ósea con y sin tratamiento de CasNa, se determinó mediante la técnica de incorporación del nucleótido timidina marcado con tritio  $[\beta\text{-}^3\text{H}]$ .<sup>91</sup> La técnica permite cuantificar la síntesis de DNA utilizando la emisión de partículas beta por parte del

nucleótido marcado, 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.

9. Al sexto día se colocó la placa a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Posteriormente se volvió a incubar por una hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se congeló una vez mas, repitiéndose el proceso dos veces con el fin de liberar los núcleos y despegar la población adherente. Finalmente se cosecharon las células y se cuantificaron en cuentas por minuto (cpm) en un contador de emisión beta.
10. Por último al obtener los resultados se procedió a realizar un análisis estadístico mediante un análisis de varianza (ANOVA ).

**NOTA:** El experimento se realizó tres veces por lo que se utilizaron 18 ratones en total.

**Tipo de estudio**

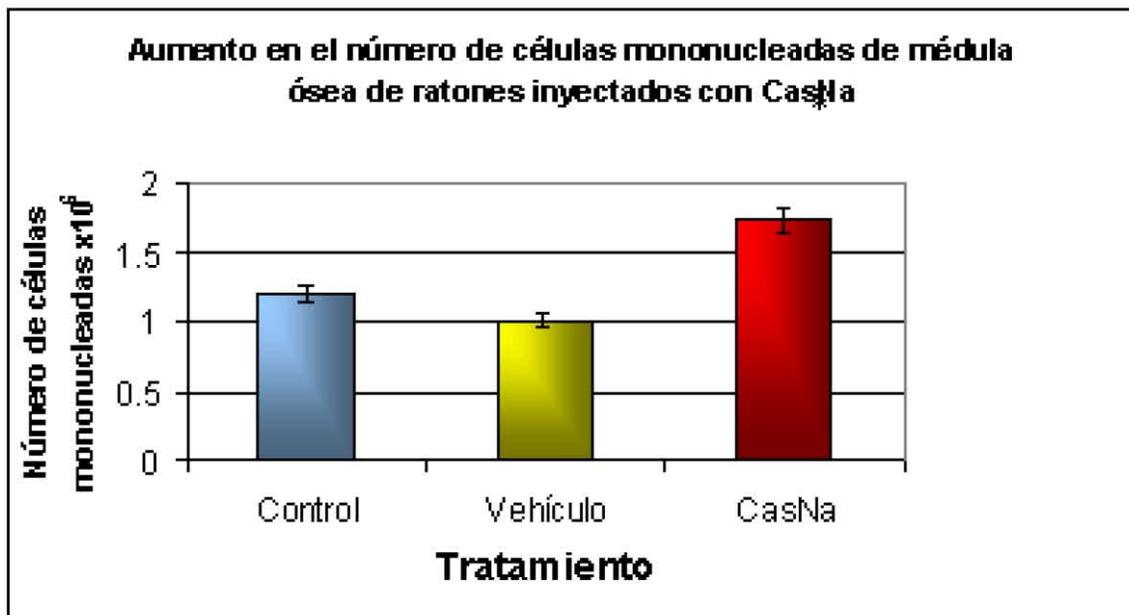
- Experimental, prospectivo

**Población de estudio:** 18 ratones hembra *BALB-c* (obtenidos del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza) de 2 meses de edad, criados en condiciones de esterilidad, con agua y comida *ad libitum*.

## IX. RESULTADOS

### EL TRATAMIENTO CON CasNa VÍA INTRAPERITONEAL INCREMENTA EL NÚMERO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS EN MÉDULA ÓSEA DE RATÓN

El caseinato de sodio (CasNa) una sal de la caseína, induce la proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratón en cultivos *in vitro*. Con la finalidad de mostrar si este efecto, también ocurre *in vivo* se inyectó CasNa en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (1 ml al 10% en agua Milli-Q) cada 48 horas por 7 días. Después del tratamiento, la inyección de CasNa provocó un aumento significativo en el número de células mononucleadas en médula ósea respecto al grupo tratado sólo con vehículo (1 ml de agua Milli-Q) y el grupo control los cuales presentaron un número de células similares (Gráfica 1).

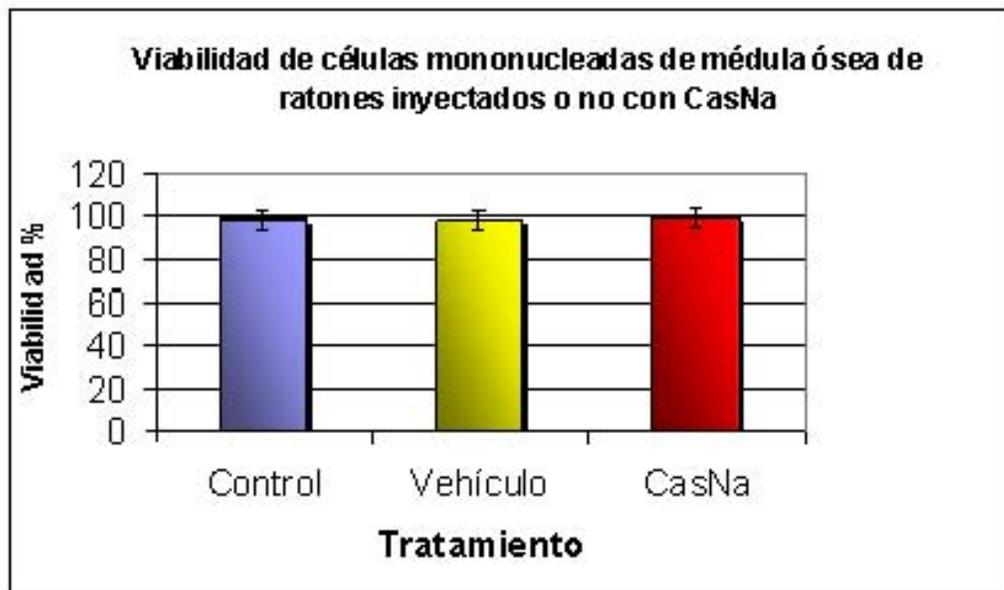


**Gráfica 1.** Número de células mononucleadas obtenidas en ratones tratados con CasNa, vehículo o sin tratamiento (control).

\*La diferencia fue significativa con respecto al vehículo y control (t-Student con  $p < 0.05$ ).

## EL CasNa NO ALTERA LA VIABILIDAD DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA

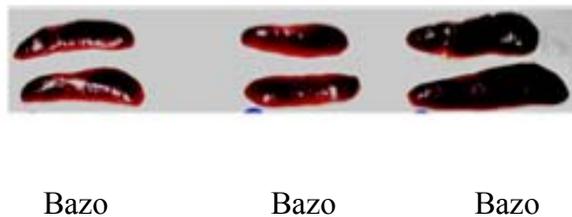
Estudios *in vitro* han mostrado que no existe alteración en la viabilidad de las células mononucleadas tratadas con CasNa por 7 días. Para confirmar que esto ocurre *in vivo*, se utilizó la prueba de exclusión de azul tripano en células mononucleadas obtenidas de ratones tratados o no con CasNa durante 7 días. Los resultados en estos experimentos muestran una viabilidad celular mayor al 90% independientemente del tratamiento (Gráfica 2).



**Gráfica 2.** Porcentaje de viabilidad de las células mononucleadas de médula ósea después de la administración de CasNa o no por vía intraperitoneal (t-Student con  $p < 0.05$ ).

## EL CasNa INCREMENTA EL TAMAÑO DEL BAZO

Se ha mostrado que la activación de la hematopoyesis extramedular en bazo, comúnmente se ve reflejada por el incremento en el tamaño y peso de este órgano.<sup>48</sup> Con la finalidad de tener otro parámetro del efecto del CasNa en la hematopoyesis *in vivo* se extrajo el bazo de ratones tratados o no con CasNa. Se observó que el bazo de los ratones tratados con CasNa era más grande en comparación con los bazos del ratón vehículo y el ratón control (Figura 4).



**Figura 4.** El Bazo de ratones tratados con CasNa durante 7 días aumenta en tamaño considerablemente en comparación con los de ratones control y vehículo.

Para corroborar el aumento en peso del bazo se realizó el cálculo del **índice esplénico**, el cual es producto de la división del peso del bazo entre el peso del ratón:

$$\text{ÍNDICE ESPLÉNICO} = \frac{\text{Peso del bazo}}{\text{Peso del ratón}}$$

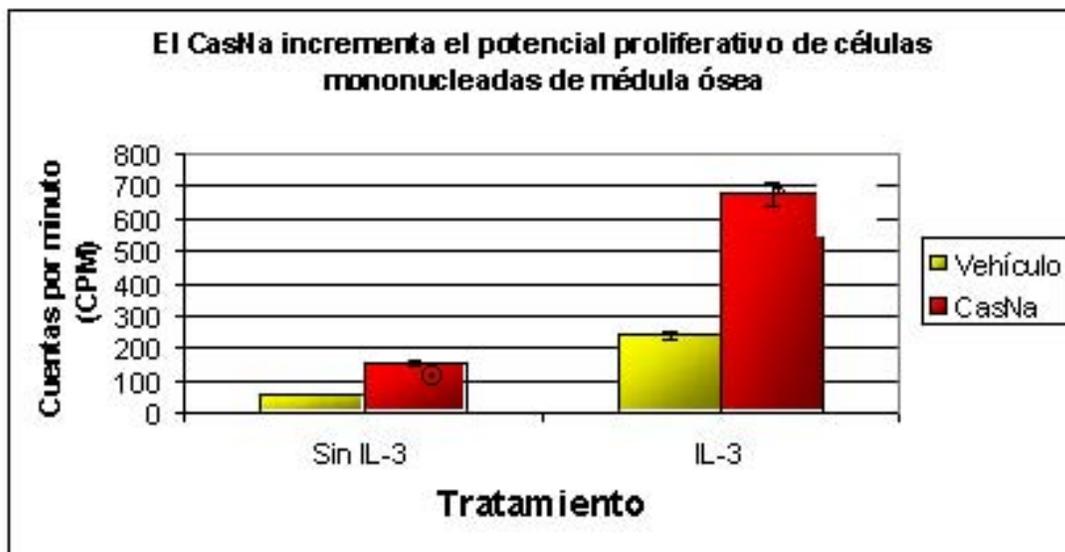
Los resultados indicaron que efectivamente el índice esplénico es mayor en ratones inyectados con CasNa (Tabla 4).

Tratamiento	Control	Vehículo	CasNa
Índice esplénico	0.0039	0.0041	*0.0070

**Tabla 4.** El índice esplénico muestra el aumento del bazo en ratones tratados con CasNa, siendo menor en ratones tratados con vehículo y ratones control, los cuales presentaron un índice similar. \*La diferencia fue significativa con respecto al vehículo y control (t-Student con  $p < 0.05$ ).

## EL CasNa AUMENTA EL POTENCIAL PROLIFERATIVO DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DE MÉDULA ÓSEA

Con la finalidad de mostrar que las células mononucleadas de médula ósea de ratones tratados con CasNa tiene mayor potencial de proliferación, se cultivaron las células mononucleadas de ratones vehículo y ratones CasNa en ausencia de IL-3. Los datos revelaron que las células mononucleadas de médula ósea proveniente de ratones tratados con CasNa tienen mayor potencial proliferativo ya que incorporaron mayor cantidad de timidina tritiada aún en ausencia de IL-3. La adición de IL-3 aumenta la proliferación de células de médula ósea en los ratones tratados o no con CasNa, pero con significativo incremento en la proliferación de células provenientes de ratones inyectados con CasNa (Gráfica 3).



**Gráfica 3.** El CasNa aumenta el potencial proliferativo de las células mononucleadas provenientes de ratones tratados o no con CasNa y cultivadas sin IL-3 y con IL-3.\* La diferencia fue significativa con respecto al vehículo con IL-3, ⊙ con respecto al vehículo sin IL-3 (ANOVA con  $p < 0.05$ ).

**Resumen del análisis de varianza de la proliferación de células mononucleadas de médula ósea.**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	Fc	Probabilidad	F t
Tratamiento	43857506.25	1	43857506.25	208.8627974	5.9433E-09	4.747221
Adición o no de IL-3	22752900	1	22752900	108.356237	2.31748E-07	4.747221
Tratamiento vs adición o no de IL-3	27284952.25	1	27284952.25	129.9392497	8.55342E-08	4.747221
Subtotal	2519788.5	12	209982.375			
Total	96415147	15				

Ho: No hay efecto del tratamiento con CasNa y Agua Milli-Q en la proliferación de células mononucleadas de médula ósea dada en cpm.

Ha: Hay efecto del tratamiento con CasNa y agua Milli-Q en la proliferación de células mononucleadas de médula ósea dada en cpm.

$$F \text{ calculada.} = \frac{43857506}{209982.375} = 208.8627974 \quad F \text{ tablas} = 4.747221283$$

Ho: No existe diferencia en la proliferación de células mononucleadas de médula ósea dada en cpm entre la adición del componente IL-3 y el no agregar ninguno.

Ha: Hay diferencia en la proliferación de células mononucleadas de médula ósea en cpm entre la adición del componente IL-3 y el no agregar ninguno.

$$F \text{ calculada.} = \frac{22752900}{209982.375} = 108.356237 \quad F \text{ tablas} = 4.747221283$$

Ho: No hay interacción por la adición de IL-3 y el tratamiento con CasNa en la proliferación de células mononucleadas de médula ósea en cpm.

Ha: Hay interacción por la adición de IL-3 y el tratamiento con CasNa en la proliferación de célula mononucleadas de médula ósea en cpm.

$$F \text{ calculada.} = \frac{27284952.25}{209982.375} = 129.9392497 \quad F \text{ tablas} = 4.747221283$$

Conclusión:  $F \text{ Calc} > F \text{ Tablas}$ ; por lo tanto se rechaza Ho, se acepta Ha para los tres casos.<sup>92</sup>

## X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La hematopoyesis es regulada por una serie de mensajeros celulares conocidos como factores de crecimiento hematopoyéticos, miembros de la familia de citocinas, aunque también existen otras biomoléculas que pueden modular la hematopoyesis *in vitro* e *in vivo*, como es el caso del ácido retinoico el cual se emplea actualmente para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda.<sup>93</sup>

Recientemente nuestro grupo aportó datos de que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína,<sup>91</sup> modula la hematopoyesis *in vitro*.<sup>61, 95, 85</sup> En este trabajo se aportan evidencias referentes a que la inyección de CasNa vía intraperitoneal en ratón, eleva significativamente el número de células mononucleadas en médula ósea, e incrementa el peso y tamaño del bazo (índice esplénico), todos parámetros empleados para evidenciar hematopoyesis *in vivo*.<sup>96,97,98</sup>

Por otro lado detectamos aumento en la incorporación de timidina tritiada en las células de médula ósea provenientes de ratones inyectados con CasNa en relación a los no tratados, evidencia contundente de que las células provenientes de ratones tratados con CasNa tienen mayor síntesis de DNA y por tanto mayor potencial proliferativo. Además, recientemente se mostró en nuestro laboratorio que las células mononucleadas obtenidas de médula ósea de ratones inyectados con CasNa contienen un mayor número de unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos, mientras que por citometría de flujo se tienen

evidencias que existe proliferación de células del linaje de linfocitos T, así como la proliferación de granulocitos y macrófagos en médula ósea y células de bazo, pero sólo en bazo se observó proliferación de linfocitos B (trabajo de tesis de licenciatura y de maestría en proceso).

Este conjunto de datos indica que el CasNa modula la hematopoyesis in vivo en ratón, aunque para una conclusión definitiva será necesario mostrar que tal efecto es específico de esta proteína.

Por otro lado se conoce que la administración de agentes inflamatorios se traduce en una reducción del peso de los ratones inyectados.<sup>99</sup> El CasNa ha sido empleado como un agente pro-inflamatorio (induce la acumulación de granulocitos y macrófagos en la cavidad peritoneal de ratones y peces),<sup>81,82</sup> sin embargo nosotros no detectamos diferencias en el peso de los animales tratados con o sin CasNa, tampoco se detectaron alteraciones en la viabilidad celular, lo cual indica que el CasNa no se comporta como un factor pro-inflamatorio clásico. Esta aseveración parece ser apoyada por el hecho de que el perfil de citocinas inducida en suero y fluido peritoneal de ratones inyectados con LPS y tioglicolato (dos clásicos pro-inflamatorios), son diferentes en tipo y vida media de aquellos inducidos por el CasNa,<sup>83</sup> además la inyección de caseína en ratones no induce la expresión de interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), tres citocinas pro-inflamatorias clásicas.<sup>100</sup>

Este conjunto de datos sugiere que el CasNa y las caseínas merecen un análisis más profundo para reconsiderarlos como agentes proinflamatorios, donde el

análisis del perfil de citocinas pro-inflamatorias puede ser de gran utilidad para tener indicios del potencial biomédico de este factor.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por medio del cual el CasNa activa la hematopoyesis in vivo, sin embargo, es conocido que la inyección intraperitoneal de CasNa en ratones, eleva la concentración de factores estimuladores de colonias tipo granulocitos (G-CSF) y de macrófagos (M-CSF) en suero y fluido de la cavidad peritoneal,<sup>83</sup> así como de granulocito-macrófagos (GM-CSF) en suero de ratones,<sup>41</sup> tres citocinas con reconocida actividad estimuladora de la hematopoyesis. Por otro lado se ha mostrado que el CasNa induce la liberación de M-CSF en granulocitos<sup>81</sup> y la expresión del gen de este mismo factor en las células 32D.<sup>85</sup> Este conjunto de datos sugiere que el CasNa puede modular la hematopoyesis vía inducción a la producción de citocinas, aunque para su confirmación será pertinente detectar el tipo de factor hematopoyético en suero de los ratones tratados con CasNa.

Llama la atención que el incremento del número de células mononucleadas de médula ósea de ratones tratados con CasNa, es similar al reportado en monos después de la inyección del GM-CSF<sup>101</sup> una citocina con reconocida actividad hematopoyética y que incluso se emplea para inducir recuperación hematopoyética en pacientes mielosuprimidos,<sup>40</sup> lo cual sugiere que el CasNa puede tener un uso clínico potencial similar al GM-CSF, aunque para ello es necesario analizar comparativa y simultáneamente el efecto de ambas moléculas.

Se ha mostrado que el CasNa *in vitro* induce la diferenciación macrofágica<sup>61,95</sup> y granulocítica,<sup>84</sup> dos poblaciones que integran una de las primeras barreras inmunológicas innatas, además, *in vivo* induce un incremento del tamaño de los centros germinales<sup>102</sup> los cuales están constituidos por linfocitos B, T, células naturales asesinas (NK) y células dendríticas,<sup>103</sup> adicionalmente la inyección de  $\beta$ -caseínas actúa como adyuvante en la inducción a la producción de anticuerpos de ratas todas funciones importantes en la activación de la respuesta inmune específica, lo cual nos obliga a reconsiderar la relevancia del CasNa en la activación inmune, incluyendo la hematopoyesis.

Por otro lado, existe la posibilidad de que el CasNa pueda inhibir el desarrollo de tumores sólidos, ya que una dieta baja en caseínas aumenta la incidencia de tumores de colon,<sup>63</sup> y por el contrario una dieta rica en caseínas protege contra el desarrollo de cáncer intestinal en ratas,<sup>80</sup> datos que apoyan la hipótesis de que el CasNa pueda tener relevancia fisiológica en el control de problemas oncológicos y abre la necesidad de estudiar si por vía gástrica, también activa la hematopoyesis, al igual que por vía intraperitoneal como se muestra en este trabajo.

El CasNa al actuar como quimioatrayente sobre granulocitos-neutrófilos y monocitos-macrófagos,<sup>81,83</sup> acelerar la transición de granulocitos en banda a polimorfonucleares en forma similar al G-CSF<sup>81</sup>, inducir la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D hacia el linaje monocito-macrófago,<sup>104</sup> estimular la proliferación de células mononucleadas de

médula ósea normal de ratón (tesis en proceso) pero frenar a las células leucémicas *in vitro*,<sup>101</sup> aunado a la activación de la hematopoyesis *in vivo* como se muestra en este trabajo, permite sostener que el CasNa es una molécula con actividad hematopoyética a pesar de no ser una citocina, pero es innegable que para realizar la función potenciadora de la hematopoyesis requiere al menos de la IL-3.

Finalmente datos previos de estudios *in vitro* indican que el CasNa suprime la proliferación de células leucémicas, <sup>101</sup> pero no de células normales, de confirmarse esta observación *in vivo* sería una molécula interesante en el contexto de la terapia de problemas hemato-oncológicos, como una estrategia de purga de médula ósea en pacientes leucémicos, lo cual evitaría la necesidad de trasplante de células de médula ósea, y en el mejor de los casos del uso de radio y quimioterapia con indudable incremento de la calidad de vida de los pacientes.

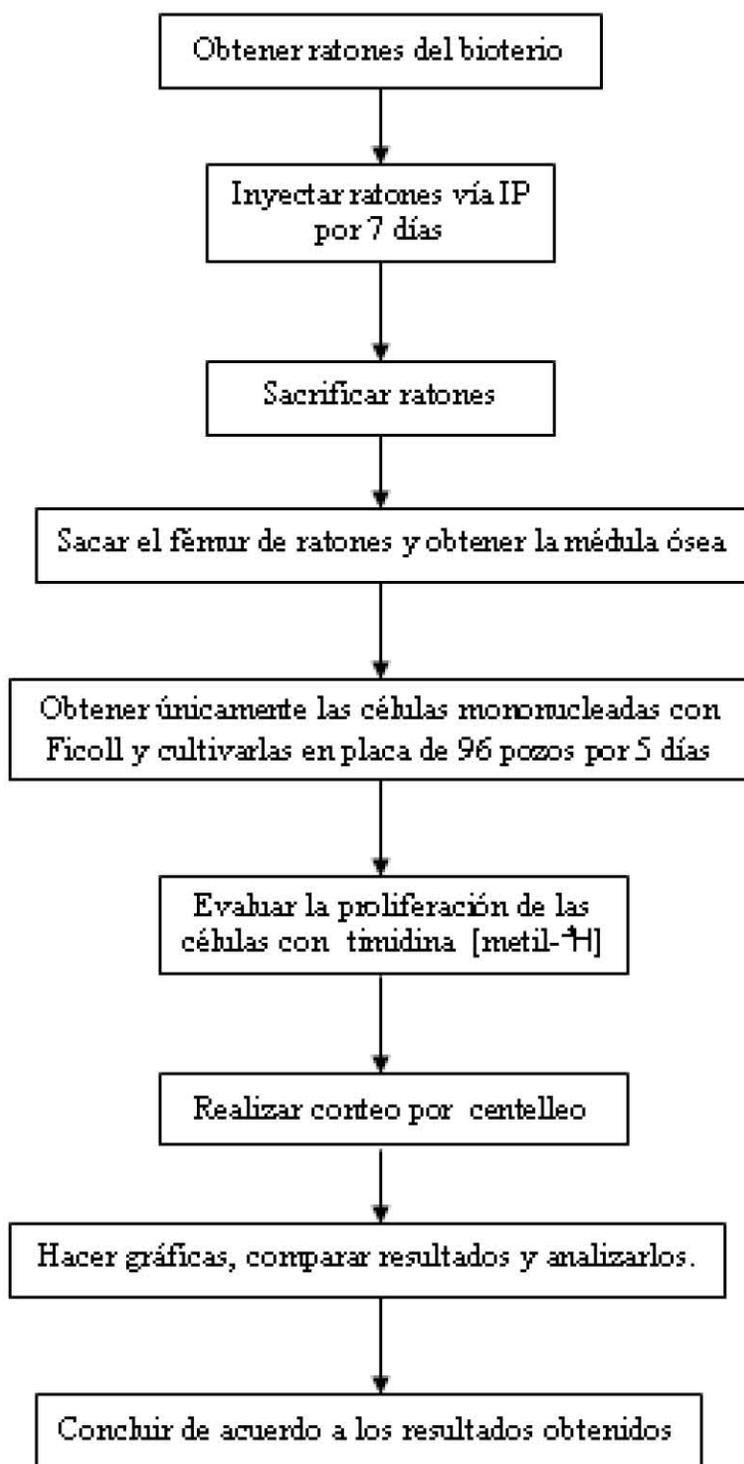
## **XI. CONCLUSIONES**

1. La inyección de CasNa vía intraperitoneal, incrementó el número de células mononucleadas de médula ósea.
2. El potencial proliferativo de estas células también aumentó sin afectar su viabilidad.
3. Aumentó el peso y tamaño del bazo, confirmado por un mayor índice esplénico,
4. Todos constituyen evidencias de que el CasNa induce la hematopoyesis normal "*in vivo*".

### **Perspectivas**

Considerando que el CasNa inhibe la proliferación de células leucémicas "*in vitro*", es factible que también lo haga "*in vivo*", de ser así, se abre una interesante opción terapéutica para problemas de leucemia.

## XII. Diagrama de Flujo



### **XIII. APÉNDICE**

#### **I. INACTIVACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO (SFB)**

La botella de suero fetal bovino (SFB) congelado se coloca a temperatura ambiente para su descongelación, posteriormente se pasa a un baño de agua a 56 °C durante 30 minutos con el propósito de inactivar proteínas del complemento. Posteriormente se separan alícuotas de 50 ml para su mejor manipulación conservándose en refrigeración a 4 °C.

#### **II. PREPARACIÓN DE COLORANTE AZÚL TRIPANO**

Para las pruebas de viabilidad y conteo celular se empleó una solución del colorante azul tripano al 0.4% (Sigma, Chem. USA).

## I. ABREVIATURAS

CasNa	Caseinato de sodio
CFU	Unidades formadoras de colonias
CFU-S	Unidades formadoras de colonias del bazo
HSC	Células tallo hematopoyéticas
LT-HSC	HSC reconstituyente a largo plazo
ST-HSC	HSC reconstituyente a corto plazo
MPP	Progenitor multipotente
CLP	Progenitores linfoides comunes
CMF	Progenitores mieloides comunes
CPH	Célula progenitora hematopoyética
CFU-G	CFU de granulocitos
CFU-E	CFU de eritrocitos
CFU-MK	CFU de megacariocitos
CFU-GM	CFU de granulocito-macrófagos
CFU-preB	CFU de células B
CSF	Factor estimulador de colonia
GM-CSF	CSF de granulocito-macrófago
M-CSF	CSF de macrófago
G-CSF	CSF de granulocito
SCF	Factor de células tallo
TNF	Factor de necrosis tumoral
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
IFN $\gamma$	Interferón gama
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
IL	Interleucina
Células NK	Células naturales asesinas
CPP	Caseinofosfopéptidos
SFB	Suero Fetal Bovino

#### **XIV. BIBLIOGRAFIA**

1. Gordon M, Barret M. Bone marrow disorders, the biological basis of clinical problems chapter 2; Haematopoietic precursor cells. Blackwell Sci Publ. London England. 1985; 20-59.
2. Till JE, Mc Culloch EA. A direct measurement at the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961; 14: 213-214.
3. Becker AJ, Mc Culloch EA. Till J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963; 197: 452-454.
4. Williams JW, Beutler E, Erslev AJ, Rundles WR. *Hematología.* 2ª edición España: Editorial Salvat, 1983: Vol. I: 61.
5. Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers.* 1997; 43: 119-120.
6. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 759-806.
7. Mebtus RE, Schadee EIL, Weissman IL. MaDCAM-1 dependent colonization of developing lymph nodes involves a unique subset of CD4+ CD8+ hematolymphoid cells. *Cell Adhesion Comm.* 1998; 6: 97-101.
8. Passegué E, Jamieson C, Alies L, Weissman I. Normal and leucemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of

- stem cell characteristics?. Proc Natl Acad Sci. 2003; 100: 11042-11049.
9. Morrison S, Weissman I. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994; 1: 661-673.
  10. Morrison SJ, Wandycz AM, Herrmati HD, Wrigth DE, Weissman IL. Identification of lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997; 124: 1929-1933.
  11. Weissman IL. The road ended up at stem cells. *Immunol.* 2002; 185: 159-165.
  12. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997; 91: 661-672.
  13. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. Lymphoid development from hematopoietic stem cells. *Int J Hematol.* 1999; 69: 217-221.
  14. Traver D, Akashi K, Manz M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. Development of CD8 alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science*. 2000; 290: 2152-2154.
  15. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*. 2001; 97: 3333-3340.
  16. Greenberger JS. The hematopoietic microenvironment. *Oncol Hematol.* 1991; 11: 65-84.
  17. Zambrano RIR, Santiago OE, Weiss SB, Cáceres CR. Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev Inv Clín.* 1999; 51: 53-68.

18. Klein G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*. 1995; 51: 914-917.
19. Quessenberry P, Colvin G, Lambert J. The chiaroscuro stem cell: A unified stem cell theory. *Blood*. 2002; 100: 4266-4271.
20. Metcalf D. Stem cells, pre-progenitor cells and linaje-committed cells: Are our dogmas correct. *Ann NY Acad Sci*. 1999; 872: 289-303.
21. Morrison S, Uchida N, Weissman I. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Biol*. 1985; 11: 35-38.
22. Dirección electrónica de <http://www.tusalud.com.mx>, 2005.
23. Dirección electrónica de <http://www.acm.uiuc.edu>.com.mx, 2005.
24. Reya T, Morrison S, Clarke M, Weissman I, Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414: 105-111.
25. Szilvassy S, Meyerrose T, Grimes B. Effects of cell cycle activation on the short-term engraftment properties of *ex vivo* expanded murine hematopoietic cells. *Blood*. 2000; 95 :2829-2837.
26. Akashi K, Reya T, Dalma W D, Weissman I. Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 144-150.
27. Bondurant M, Koury M. Origin and development of blood cells. En: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Geer J, Rodgers G. 10ª edición. USA: Witrobe Clinical Hematology. Lippincott Williams & Wilkins editores, 1999: 145-168.
28. Munker R, Hiller E, Paquette R. Modern hematology. 10ª edición. USA: Human Press, 2000: 150-158.

29. Mayani H. A glance into somatic stem cell biology, basic principles, new concepts and clinical relevance. Arch Med Res. 2003; 34: 3-15.
30. Eliseiv V. Histology. Moscu: Editorial Mir. 1988: 584-587.
31. Hughes N. Lecture notes on hematology. Fifth edition. USA: Blackwell Scientific Publications, 1991;14-20.
32. García CJ, Sierra J. Hematología. 1ª edición España: Ediciones Aran, 2003: 39-46.
33. Allen TD, Dexter TM, Simons PJ, Marrow biology and stem cell. In Dexter TM, Garland J.M, Testa N.G.(ed): Colony stimulating factors: Molecular and cellular biology Marcel Dekker. New York. 1990: 1-5.
34. Smith C. Hematopoietic stem cells and Hematopoiesis. Cancer control. 2003; 10: 9-16.
35. Hao Q, Thiermn F, Peterse D. Extended long term culture reveals a highly quiescent and primitive human haematopoietic progenitor population . Blood. 1996; 88: 3306-3313.
36. Kaufman. D Hanson E, Lewis R, Auerbach R, Thomson J. Haematopoietic colony forming cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci. 2001; 98: 10716-10721.
37. Schmidt M, Zickler P, Hoffman G, Haas S, Wissier M, Muessing A, Tisdale J, Kuramoto K, Andrews R, Wu T, Kiem T, Dunbar C, Kalle C. Polyclonal long-term repopulating stem cells clones in a primate model. Blood. 2002; 100: 2737-2743.
38. Zhu J & Emerson S, Hematopoietic cytokines, transcription factors and

- linage commitment. *Oncogene*. 2002; 21: 3295-3313.
39. Pluznik D, Sachs L. The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol*; 1965; 66: 319-324.
  40. Sachs L. The control of haematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 4742-4749.
  41. Metcalf D, Burgess AW. Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. *J Cell Physiol*. 1982; 111: 275-281.
  42. Aguirre de Ávalos M, Quintana R, Brandan N. Citoquinas, Cátedra de Bioquímica, UNNE, 2002: 1-19.
  43. Quesenberry P, Levitt L. Hematopoietic stem cells. *N. Engl J Med*. 1979; 301: 755-757.
  44. Dorshkind K. Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Immunol*. 1990; 8: 111-115.
  45. Begg SK, Radley JM, Pollard JW, Stanley ER, Crisholm OT, Bertoncello I. Delayed hematopoietic development in osteopetrotic (OP/OP) mice. *J Exp Med*. 1993; 177: 237-240.
  46. Worton RG, McCulloch JE. Physical separation of hematopoietic stem cells. *J Cells Physiol*. 1969; 72: 221-224.
  47. Magli MC, Iscove NN, Odartchenko N. Transient nature of early hematopoietic spleen colonies. *Nature*. 1992; 295: 527-531.
  48. Nilsson SK, Bertoncello I. Age-related with changes in extramedullary hematopoiesis in the spleen of normal and perturbed osteopetrotic (op/op) mice. *Hematol*. 1994; 22: 377-383.

49. Miales JB. Hematología Médica de Laboratorio. España: Editorial Reverte. 1985: 115-123.
50. Dirección electrónica de:[http://plato.wilmington.edu/faculty/dtroike/mouse anatomy. htm](http://plato.wilmington.edu/faculty/dtroike/mouse%20anatomy.htm).
51. Langman J. Embriología Médica. 5a edición. México: Editorial Médica Panamericana, 1986: 350-351.
52. Weiss L. The structure of intermediate vascular pathways in the spleen of rabbits. Am J Anat. 1963; 113: 51-55.
53. Mc Kenzie S. B. Hematología Clínica. 2ª edición. México: Editorial El Manual Moderno, 2000:14-17.
54. Weiss L The spleen in the cells and tissues of the immune system, structure, functions, interactions. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 1972: 49-51.
55. Fujii S Hamada H, Fujimoto K, Shimomura T, Kawakita M. Activated dendritic cells from bone marrow cells of mice receiving cytokine expressing tumor cells associated with the enhanced survival of mice bearing syngeneic tumors. Blood. 1999; 93: 4328-4334..
56. Lynch M. J Métodos de Laboratorio. 2ª edición. México: Editorial Interamericana, 1977: 788-796.
57. Nieto Camacho R. Principios Universales en Hematología. 1ª edición. México: Editorial Chronolab. AG, 2004: 233-291.
58. Ruiz Argüelles G.J. Fundamentos de Hematología. 3ª edición. México: Editorial Medica Panamericana, 2003: 224-260.

59. Dawson M, Elstner E, Kizaki M, Chen D, Pakkala S, and Koeffler P. Myeloid differentiation mediated through retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RXR) not RXR/RXR pathway. *Blood*. 1994; 84: 446-452.
60. Breitman T, Chen Z, and Takahashi N. Potential applications of cytodifferentiation therapy in hematologic malignancies. *Sem hematol*. 1994; 31: 18-25.
61. Bautista AMA. Efecto de factores activadores y diferenciadores sobre el granulocito-neutrófilo en banda, diferenciación, fragmentación del DNA y producción de M-CSF. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. 1998.
62. Eigel WN, Butler JE, Erstrom HM, Farrel VR, Harwalker R, Janness RM, Whitney R. Nomenclature of proteins of cows milks. *J Dairy Sc*. 1984; 67: 1539-1545.
63. Tatsuta M, Lishi H, Baba M. Taniguchi H. Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in Winstar rats fed a low-protein diet. *Int J Cancer*. 1992; 50: 108-111.
64. Kon S. La leche y los productos lácteos en la nutrición humana, 2ª edición. Rumania: FAO, 1977: 38-47.
65. Walstra P and Jenneis R. Dairy chemistry and physics. New York: John Wiley Sons, 1984:106-107.
66. Sorenson C & O'donnell J. Nutritional properties of whey, lactose and milk minerals products. Whey protein institute & California Dairy Research Foundation Davis. 2003;1-32.

67. Brophy B, Smoleski G, Wheeler T, Wells D, Huillier P, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein. *Nature Biotech.* 2003; 21: 157-162.
68. Marchesseau S, Mani J, Martineau P, Cuq J, Pugniere M. Casein interactions studied by the surface resonance technique. *J Dairy Sci.* 2002; 85: 2711-2721.
69. Díaz M, Dunn C, McClements J. and Decker E. Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil water emulsions. *J Agric Food Chem.* 2003; 31: 2363-2370.
70. Teschemacher H, Koch G, Brantl V. Milk protein-derived atypical opioid peptides and related compounds with opioid antagonist activity. Germany: Brantl V, Teschemacher H, editors.  $\beta$ -casomorphins and related peptides: Recent developments UCH. 1994: 3-17.
71. Fiat A, Aigliomere-Samour D, Jolles P, Drouet L, Sollier C, Caen J. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antitrombotic and immunomodulatory activities. *J Dairy Sci.* 1993; 76: 301-310.
72. Sandre A, Gleizes A, Forestier F, Gorgs R, Chilmonczyk S, Leonil J, Moreau M, Labarre C. A peptide derived from Bovine  $\beta$ -casein modulates functional properties of bone marrow derived macrophages from germfree and human flora associated mice. *J Nutr.* 2001; 131: 2936-2942.
73. Wong C, Scow H, Liu A, Hunsbad A, Smithers G, Watson D. Modulation of immune responses by bovine  $\beta$ -casein. *Immunol Cell Biol.* 1996; 74:

323-329.

74. Nakajima M, Shinoda I, Samejima Y, Miyauchi H, Fukuwatari Y, Hayasawa H. Kapa-casein suppresses melanogenesis in cultured pigment cells. *Pigment Cell Res*; 1996; 9: 235-239.
75. Ferratetto A, Signorile A, Gravahi C, Fiorilli A, Tettamanti G. Casein phosphopeptides influence calcium uptake by cultured human intestinal HT-29 tumor cells. *Biochem Mol Act Nutri*. 2001; 43: 1655-1660.
76. Hira T, Hiroshi H, Tomita F, Aoyama Y. Caseins bind to the cell membrane and induces intracellular calcium signals in the enteroendocrine cell: a brief communication. *Exp Biol Med*. 2003; 228: 850-854.
77. Pessi T, Isolauri E, Sujas Y, Kankaanranta H, Moilanen E, Hurme M. Suppression of T-cell activation by *Lactobacillus rhamnosus* GG-degraded bovine casein. *Immunopharm*. 2001; 1: 211-218.
78. Mulvihill D & Fox P. Proteolytic specificity of chemosin on bovine alpha s1 casein. *J Dairy Res*. 1979; 46: 641-651.
79. Lahov E & Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein derived substances from milk, casecidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol*. 1996; 34: 131-145.
80. McIntosh GH, Register GO, Leu LRK, Rugle PJ, Smithers GW. Dairy protein protect against dimethylhydrazine induced intestinal cancer in rats. *J Nutr*. 1995; 125: 89-92.
81. Passotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G. The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Rev Eur Med Farmacol*. 1993; 2: 71-81.

82. Aranishi F, Hara K, Osatomi K, Ishiara T. Cathepsins B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. *Comp Biochem Physiol* 1997; 117: 605-607.
83. Lotem J, Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins, *in vivo* regulation by compounds that induction inflammation. *Int J Cancer*. 1985; 35: 93-95.
84. Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. Sodium caseinate induces differentiation of 32D pluripotential hematopoietic cells. *Rev Invest Clin*. 2000; 52: 638-644.
85. Ramos MG. Efecto de caseínas y casomorfinas en la proliferación y diferenciación de las líneas celulares mieloides 32D y WEHI-3. Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. 2004.
86. Aschkenazy A. Influence of certain ant metabolites (aminopterin, 6-mercaptopurine, prednisolone and chloramphenicol) on the restoration of lymphopoeisis after and experimental nitrogen inanition. *Sciences Soc Biol Fil*. 1968; 19: 652-657.
87. Okano M, Ohnota I, Sasaki R. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J Nutr*. 1992; 122: 137-1383.
88. Vituri CI, Alvarez SM, Trentin AG, Borelli P. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matriz in undernourished mice. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33: 889-895.
89. Estadística de egresos hospitalarios de la secretaria de salud. *Rev. Salud*

- Publica de México. 2000; 42: 456.
90. Proyecciones de la población de México. Base de datos de defunciones INEGI/ Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. CONAP. 2002
  91. Karp G. Biología Celular y Molecular. México: Editorial MacGraw-Hill. 1996: 71-74
  92. Zar JH. Biostatistical Analysis. Third edition USA: Prentice–Hall, 235-249.
  93. Pendido F, Dudognon C, Delhommeau F, Sahraoui T, Flexor M, Bennaceur-Griselli A, Lanotte M, Segal BE. Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene*. 2003; 22: 9142.
  94. Hall C. Drying of milk and products. 2a edition. The avi Publishing Company Inc. ASA.185.
  95. Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. Sodium caseinate induces expression and secretion of murine multipotent myeloid cell line 32D macrophage colony-stimulating factor. *Arch Med Res*. 2004; 35: 109-113.
  96. Kuwata T, Wang IM, Tamura T, Ponnampereuma RM, Levine R, Holmes KL, Morse HC, De Luca LM, Ozato K. Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cell. *Blood*. 2000; 95: 3349-3356.
  97. Begg SK, Beroncello I. The hematopoietic deficiency in osteopetrotic (OP/OP) mice are not permanent, but progressively correct with age. *Exp Hematol*. 1993; 21: 493-498.

98. Legenvoort HL. The histophysiology of the antibody response I. Histogenesis of the plasma cell reaction in rabbit spleen. *Lab Invest.* 1963; 12: 106-110.
99. Gallin JI, Bujak JS, Patten M, Wolf SM. Granulocyte function in the Chediak-Higashi syndrome of mice. *Blood.* 1974; 43: 201-206.
100. Noursadeghi M, Bickerstaf MCM, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys MB. Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J Immunol.* 2002; 169: 913-919.
101. Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Sehgal PK, Nathan DG, Clark SC. Stimulating of hematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature.* 1986; 321: 872-875.
102. Lagunes SHE. Estimulación de la hematopoyesis medular y extramedular inducida por el caseinato de sodio (CasNa) en ratones BALB-c. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM. 2004.
103. Chaplin DD. Regulation of spleen white pulp structure and function by lymphotoxin. *Adv Exp Med Biol.* 2002; 512: 49-55.
104. Ramos MG. Papel del caseinato de sodio en la inducción de la diferenciación de la línea mieloide hematopoyética primitiva 32D. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 1999.