



**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**

**“LA INYECCIÓN DE CasNa EN RATONES BALB/c INDUCE LA  
PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE  
MÉDULA ÓSEA DEL LINAJE MIELOIDE Y LINFOIDE”.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

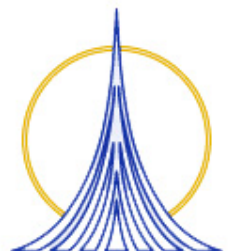
**P R E S E N T A :**

**Silvestre Santana Enrique  
Oswaldo**

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

**México, D. F.**

**Febrero 2007**





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.

## **DEDICATORIAS**

### **A mis padres**

**(Graciela Santana )**

Quien supo comprenderme en los momentos más difíciles siendo mi amiga, mi padre, mi confidente, mi maestra, mi ejemplo a seguir como persona, a quien no sé como agradecerle el haberme dado una carrera a base de sacrificios y desvelos. Gracias madre por que sin ti nada de esto tendría sentido.

**(Federico Silvestre)**

Quien siempre se preocupo por que yo tuviera todo lo necesario para terminar mi carrera y sin importar si estuvo o no a mi lado le agradezco todo su esfuerzo y consejos para hacerme una gente de provecho como él quería

A ambos quienes han sacrificado tanto para que yo pudiera ser un profesionista y ahora que he alcanzado la meta no existen palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mi durante la dura jornada

### **A mis hermanas**

**(Karen Silvestre)**

Por estar a mi lado apoyándome en todo cuanto estaba a tu alcance y también por alegrarme el día con tus incoherencias al termino de cada día.

**(Jordani Silvestre y su hija Paula Jordani)**

Por soportar durante muchos años mi carácter seco y ayudarme siempre a pesar de no merecerlo.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por la dirección de este trabajo de tesis, por todo el apoyo, confianza, facilidades y sobretodo la gran paciencia que me brindó durante la estancia en el laboratorio a pesar de tantas inconsistencias de mi parte.

A la Dra. Leticia Moreno y la Dra. Leticia Verdin de la FES Iztacala por su colaboración en la lectura de las muestras de Citometría de Flujo.

Al Dr. Mario Altamirano del laboratorio de Citogenética por su colaboración en la evaluación del índice mitótico.

Al M. en C. Edgar Ledesma quien me formo dentro del laboratorio, respondiendo todas y cada de una de mis dudas, con toda la paciencia, sin importar la magnitud de mi ignorancia.

A los tesistas Berenice Salas, Osvaldo Bandin, Alba Rodriguez, Itzen Aguiñiga y Leticia Rodriguez por su ayuda para realizar este trabajo.

A los Miembros del Jurado.

Dr. Edelmiro Santiago Osorio.  
Dra. Maria de Lourdes Mora García.  
M. en C. Luis Sánchez Sánchez.  
Dra. Lucila Álvarez Barrera  
Dra. María del Carmen García Rodríguez.

Por las sugerencias recibidas que ayudaron a enriquecer éste trabajo.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer (L-324) de la FES Zaragoza y contó con el apoyo de PAPIIT, UNAM (IN214903).

## **Agradecimientos**

A los M. en C. Vaniamin Domínguez y Yolanda Cordova por su apoyo incondicional y amistad durante el desarrollo de la presente tesis.

A los compañeros de laboratorio Angélica, Ana, Berenice, Carmina, Danahe, Edmundo, Luis, Laura, Cynthia, Vicente, Hugo, Guadalupe y Marycarmen por hacer tan amena la estancia en el laboratorio además de sus atenciones conmigo.

A mis amigos del CCH José, Fredis, Pedro, Marcelo y Carlos porque a pesar de que yo si los olvidé ellos nunca se olvidaron de mi.

A mis amigos y compañeros de generación por tolerar mi carácter bipolar y mi sarta de sandeces durante todo este largo camino: los amigordos (Paco, Noe, Ricardo (la doña), Francisco Cohetero, Ivan (el galo), Alvaro, el George, el Checo, Helio, Mario-la voz de México), Diana, Azucena, Osvaldo, Alba, Alejandra, el Cristiano, Enrique (el hinojosa), Janeth, Paulina Yonca, Paulina Pescador, Fabis, Gris, Hector (el gomo), Ulises, Rosa, Gaby, Giovanna, Magda, Mireya, Karen, Sara, Samantha, Sandra y Magda Nayeli por su amistad gracias.

## INDICE

Lista de abreviaciones.....	1
Resumen.....	3
Marco teórico.....	4
Hematopoyesis y células tallo hematopoyéticas.....	4
Ontogenia hematopoyética.....	9
Microambiente hematopoyético y citocinas.....	12
Caseínas y hematopoyesis.....	17
Justificación.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivos.....	20
Material y método.....	21
Resultados.....	26
Discusión de resultados.....	35
Conclusiones.....	39
Perspectivas.....	40
Referencias bibliográficas.....	41
Apéndice.....	55

**LISTA DE ABREVIACIONES**

<b>ATRA</b>	<b>Ácido all-transretinoico</b>
<b>Annexin V</b>	<b>Anexina V</b>
<b>BrdU</b>	<b>Bromodeoxiuridina</b>
<b>CasNa</b>	<b>Caseinato de Sodio</b>
<b>CFU</b>	<b>Unidad formadora de colonia</b>
<b>CFU-Ba</b>	<b>Unidad formadora de colonias de basófilos</b>
<b>CFU-Dc</b>	<b>Unidad formadora de colonias de células dendríticas</b>
<b>CFU-Eo</b>	<b>Unidad formadora de colonias de eosinófilos</b>
<b>CFU-E</b>	<b>Unidad formadora de colonias de eritrocitos</b>
<b>CFU-G</b>	<b>Unidad formadora de colonias de granulocitos</b>
<b>CFU-GM</b>	<b>Unidad formadora de colonias de granulocito- macrófagos</b>
<b>CFU-MK</b>	<b>Unidad formadora de colonias de megacariocitos</b>
<b>CFU-preB</b>	<b>Unidad formadora de colonias de células B</b>
<b>CLP</b>	<b>Progenitores linfoides comunes</b>
<b>CMP</b>	<b>Progenitores mieloides comunes</b>
<b>CPM</b>	<b>Cuentas por minuto</b>
<b>CSF</b>	<b>Factor estimulador de colonias</b>
<b>ECM</b>	<b>Matriz extracelular</b>
<b>Epo</b>	<b>Eritropoyetina</b>
<b>FS</b>	<b>Fosfatidil serina</b>
<b>FITC</b>	<b>Isotiocianato de fluoresceina</b>
<b>G-CSF</b>	<b>Factor estimulador de colonias de granulocitos</b>
<b>GM-CSF</b>	<b>Factor estimulador de colonias granulocito-macrófagos</b>
<b>GMP</b>	<b>Progenitores de granulocitos-macrófagos</b>
<b><sup>3</sup>H</b>	<b>Tritio</b>
<b>HSC</b>	<b>Célula tallo hematopoyética</b>
<b>IL</b>	<b>Interleucina</b>

<b>IM</b>	<b>Índice mitótico</b>
<b>IMDM</b>	<b>Medio Iscove's dulbecco modificado</b>
<b>IP</b>	<b>Ioduro de propidio</b>
<b>KCI</b>	<b>Cloruro de potasio</b>
<b>LT-HSC</b>	<b>Célula tallo hematopoyética reconstituyente a largo plazo</b>
<b>ml</b>	<b>mililitro</b>
<b>M</b>	<b>Molaridad</b>
<b>MCS</b>	<b>Célula tallo mesenquimal</b>
<b>M-CSF</b>	<b>Factor estimulador de colonias de macrófagos</b>
<b>MEP</b>	<b>Progenitores de eritrocitos-megacariocitos</b>
<b>MPP</b>	<b>Progenitores multipotentes</b>
<b>NK</b>	<b>Célula asesina natural</b>
<b>PE</b>	<b>Ficoeritrina</b>
<b>rmIL-3</b>	<b>Interleucina-3 recombinante de ratón</b>
<b>SLAM</b>	<b>Molécula de señalización de activación de linfocitos</b>
<b>Veh</b>	<b>Vehículo</b>
<b>SCF</b>	<b>Factor estimulador de células tallo</b>
<b>SFB</b>	<b>Suero fetal bovino</b>
<b>ST-HSC</b>	<b>Célula tallo hematopoyética reconstituyente a corto plazo</b>
<b>TNF-a</b>	<b>Factor de necrosis tumoral alfa</b>
<b>μl</b>	<b>Microlitro</b>



**RESUMEN**

En años recientes se ha mostrado que la hematopoyesis puede ser regulada por biomoléculas de origen natural diferentes a las citocinas. El ácido all-transretinoico (ATRA), las vitaminas E y D así como la caseína son algunos ejemplos. Nuestro equipo de trabajo ha mostrado que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína, modula la proliferación de líneas celulares leucémicas y normales de ratón así como la proliferación de células provenientes de médula ósea de ratón, todo lo anterior mostrado *in vitro*. El presente trabajo muestra el efecto del CasNa *in vivo* sobre la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas de médula ósea de ratón. Los datos obtenidos muestran un aumento en la proliferación de células precursoras provenientes de ratones tratados con CasNa sin afectar su viabilidad. Por otra parte, la proliferación de células de médula ósea de ratones tratados con CasNa no es inducida a diferenciarse hacia un linaje celular en particular, mieloide o linfoide, y ello se corroboró mediante la incorporación de BrdU empleando anticuerpos específicos del linaje y citometría de flujo. Los datos indican que el CasNa incrementa la proliferación y diferenciación del linaje de granulocitos, macrófagos y linfocitos T mientras que para la población de linfocitos B no se observó diferencia alguna. Nuestros resultados muestran que la inyección de CasNa puede modular la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas *in vivo*. Por lo que en un futuro cabe la posibilidad de emplear a esta proteína como un regulador hematopoyético en terapias de pacientes mielosuprimidos.

## MARCO TEÓRICO

### Hematopoyesis y células tallo hematopoyéticas

Las células sanguíneas maduras presentes en la circulación, desempeñan una gran variedad de funciones para el organismo, así de esta forma los eritrocitos transportan el oxígeno, las plaquetas participan en el control de la coagulación sanguínea mientras que los granulocitos, monocitos y linfocitos intervienen en la defensa inmunitaria contra los agentes patógenos, muchas de ellas mueren al realizar su función, por lo que existe la necesidad de una constante autorenovación de células. Cerca de  $2 \times 10^{11}$  eritrocitos y  $10 \times 10^{10}$  leucocitos deben ser reemplazados cada día para mantener las defensas del cuerpo y una oxigenación correcta en el ser humano (**Zambrano et al., 1999; Bellantuono et al., 2004**). Este proceso de generación, proliferación, diferenciación, autorenovación y muerte (apoptosis) de células sanguíneas, a partir de células progenitoras, es conocido como **hematopoyesis (Orkin, 1995)**.

Las células del sistema hematopoyético son continuamente generadas de progenitores con capacidad de autorenovación en la médula ósea llamados células tallo hematopoyéticas (HSCs, por sus siglas en inglés, hematopoietic stem cells) o células tallo formadoras de sangre (**Spangrudge et al., 1988; Morrison & Weissman, 1994; Baum et al., 1992; Osawa et al., 1996**), constituyen el 0.05% en la médula ósea y se concentran principalmente en el estroma, en su mayoría se encuentran en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular (**quiescentes**) y se dividen solo para mantener el estado normal de la hematopoyesis o la demanda de progenitores en el organismo (**Orlic & Bodine, 1994; Hao, 1996; Ogawa & Matsunaga, 1999; Kaufman, 2001; Mayani, 2003; Abkowitz et al., 2002; Gordon et al., 2002**) (Figura 1).

## Células tallo hematopoyéticas

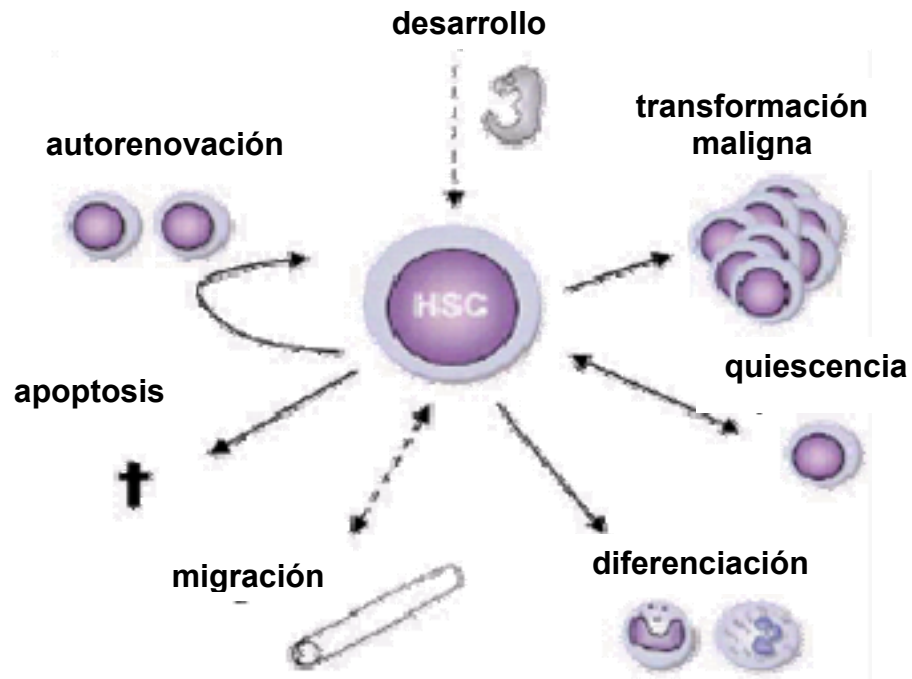


Figura 1. Elección de destino de las células tallo hematopoyéticas (HSCs). Señales de los factores reguladores externos e internos deciden si son mantenidas en quiescencia, proliferan, sufren apoptosis o migran fuera del espacio de la médula ósea sin embargo cuando estas señales sufren mutaciones las HSCs pueden desarrollar una clona maligna autorenovándose de una forma descontrolada. Tomado de Larsson & Karlsson, 2005.

Las HSCs por su capacidad de autorenovación pueden ser divididas en: células tallo hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo (LT-HSC, long-term hematopoietic stem cell), capaces de autorrenovarse indefinidamente durante toda la vida y células tallo hematopoyéticas reconstituyentes a corto plazo (ST-HSC, short-term hematopoietic stem cell), que sólo pueden autorrenovarse durante un intervalo definido de tiempo, alrededor de 4-8 semanas (**Domen & Weissman, 1999; Weisman, 2000a, 2000b**). Las LT-HSCs son mantenidas en estado quiescente o ciclan lentamente mientras que las ST-HSCs están activamente ciclando (**Passegue et al., 2005**). Las HSC de ratón no pueden ser identificadas por criterio morfológico así que son reconocidas mediante la expresión de marcadores de superficie celular, por lo que existen varias combinaciones de marcadores tales como: (Lin<sup>neg/low</sup>, Thy1.1<sup>low</sup>, c-Kit<sup>high</sup>, Sca-1<sup>+</sup>) o (Lin<sup>-</sup>, Thy1.1<sup>low</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, rodamina123<sup>low</sup>) entre otras (**Kondo et al., 2003**). Recientemente se ha mostrado que una combinación de marcadores de superficie de la familia de la molécula de activación de señalización de linfocitos (SLAM, signaling lymphocyte activation molecule) (CD150<sup>+</sup>, CD48<sup>-</sup>, CD41<sup>-</sup>) pueden ser utilizados como identificadores de HSCs de ratón y revelar además nichos endoteliales (**Kiel et al., 2005**).

Las LT-HSC pueden autorrenovarse durante toda la vida, no así las ST-HSCs que sólo son capaces de autorrenovarse aproximadamente durante 8 semanas dando origen a los progenitores multipotentes (MPPs, multipotent progenitors), quienes tienen una completa actividad de diferenciación pluripotente pero no una capacidad de autorenovación detectable (**Adolfsson et al., 2001**). De la diferenciación de los MPP descienden los precursores mieloides comunes (CMP, common myeloid precursors) y los precursores linfoides comunes (CLP, common lymphoid precursors) (**Hao et al., 2001; Kondo et al., 1997; Manz et al., 2002**). De los CMP descienden los progenitores comprometidos a la generación de eritrocitos y megacariocitos (MEP, megakaryocyte-erythrocytes precursors), granulocitos y macrófagos (GMP, granulocytes-macrophages precursors). Los CLP darán origen sólo a linfocitos B, T y células llamadas asesinas naturales (NK, natural killers). Ambos, CMPs y CLPs pueden dar origen a las células dendríticas (**Traver et al., 2000; Manz et al., 2001**). Todas estas poblaciones de precursores son separables como poblaciones puras empleando marcadores de

superficie y se ha demostrado que están desprovistas de detectable actividad autorenovadora después de una trasplatación (**Na Nakorn et al., 2002**). Cuando los progenitores multilinaje son estimulados apropiadamente, generan colonias, células comprometidas hacia determinado linaje, y normalmente se les denominan unidades formadoras de colonias (CFUs), estas pueden ser de: granulocitos (CFU-G), basófilos (CFU-Ba), eosinófilos (CFU-Eo), macrófagos (CFU-M), granulocito-macrófagos (CFU-GM), eritrocitos (CFU-E), megacariocitos (CFU-MK), células B (CFU-preB), y células dendríticas (CFU-Dc) (**Akashi et al., 2000**). Todas, son células que darán origen a las células sanguíneas maduras presentes en circulación y dependiendo del linaje al que pertenecen pueden ser aisladas empleando marcadores de superficie celular característicos como: Cd11b para células mieloides, CD3 para linfocitos T, B220 para linfocitos B y Ter-119 para células eritroides (**Rosmarin et al., 2005**). De esta manera la jerarquización de las células hematopoyéticas es representada en la **Figura 2**.

Cascada hematopoyética

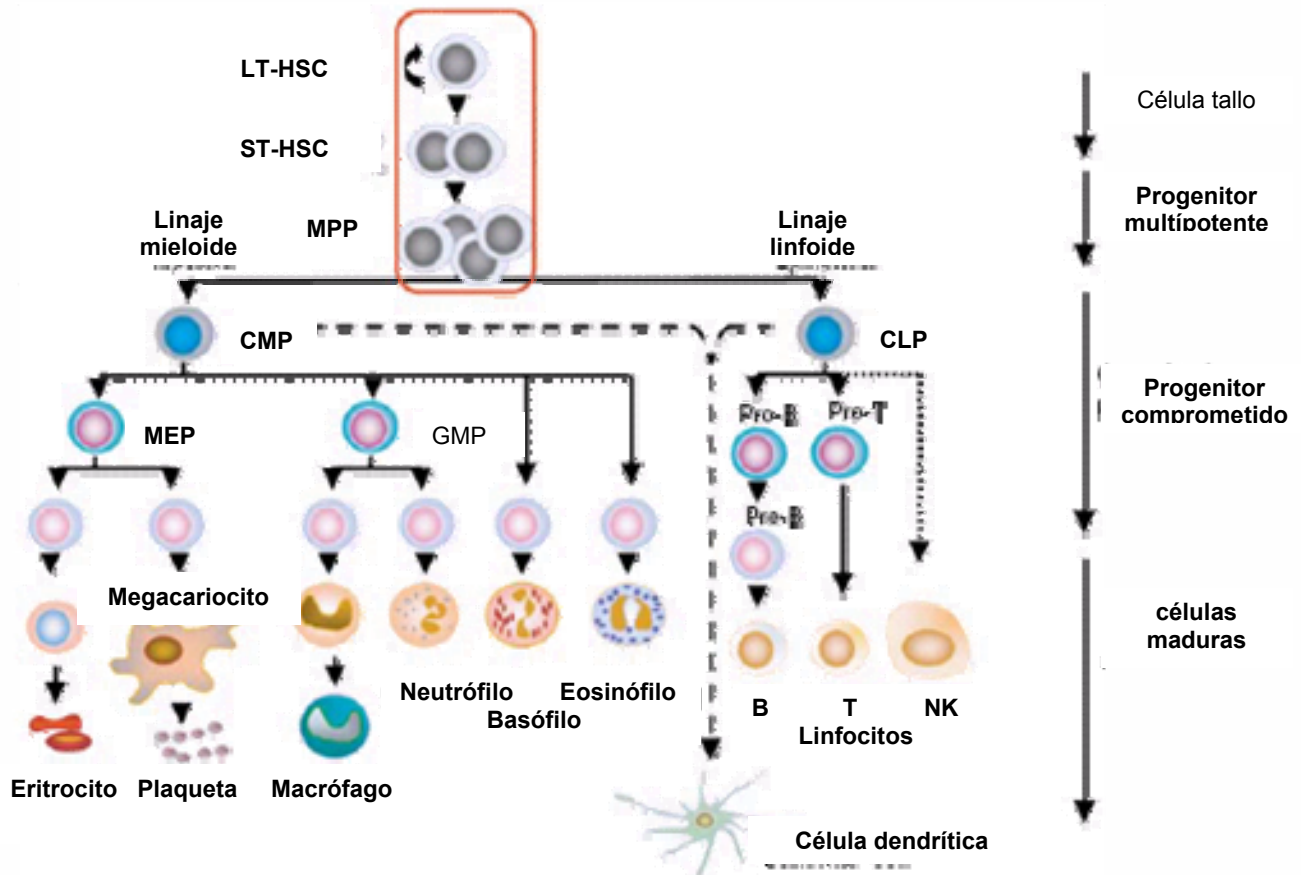


Figura 2. Jerarquía de las células hematopoyéticas. LT-HSCs, células tallo reconstituyentes a largo plazo; ST-HSCs, células tallo reconstituyentes a corto plazo; MPP, progenitores multipotentes; CMP, progenitores mieloides comunes; CLP, progenitores linfoides comunes; MEP, progenitores megacariocitos-eritrocitos; GMP, progenitores granulocitos-macrófagos. Las poblaciones pluripotentes encerradas en un recuadro expresan los marcadores:  $Lin^{-}$ ,  $Sca-1^{+}$  y  $c-kit^{+}$ . Tomado y modificado de Larsson & Karlsson, 2005.

## Ontogenia hematopoyética

La actividad hematopoyética inicia en el saco vitelino durante los primeros 7 días de gestación y son las células mesodermales quienes se encargan de producir las primeras células sanguíneas del embrión en estructuras llamadas islotes sanguíneos (**McKenzie, 1991; McGrath & Palis, 2005**). Sin embargo, las primeras HSCs capaces de colonizar la médula ósea adulta han sido identificadas en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) (**Medvinsky et al., 1993; Takeuchi et al., 2002**) y aunque el saco vitelino es el primer sitio donde las HSCs pueden ser encontradas no es claro si también producen las HSCs definitivas, de cualquier forma se considera que, de este sitio, las células sanguíneas migran a otros órganos con actividad hematopoyética como: el bazo, hígado y timo (**Toles et al., 1989**) (**Figura 3**).

La hematopoyesis hepática se desarrolla a partir de la sexta semana hasta el nacimiento, a pesar de que la eritropoyesis predomina debido a la alta demanda de oxígeno, se pueden detectar también células de la serie granulocítica y megacariocítica. La actividad del hígado disminuye gradualmente en los últimos meses de vida intrauterina y al momento del nacimiento solo restan pequeños islotes hematopoyéticos. La hematopoyesis en bazo se desarrolla en el mismo periodo que la hepática y aunque su contribución es menor, ambos órganos son importantes para el desarrollo de la linfopoyesis. En bazo se activa la eritropoyesis, linfopoyesis y mielopoyesis (**Lipschitz et al., 1984**). La eritropoyesis continua hasta el término de la gestación mientras que la linfopoyesis sigue toda la vida (**Miales, 1985**). En humanos generalmente no funciona como un sitio hematopoyético, su papel en la hematopoyesis fetal es algo controversial y mínimo. No obstante, en el bazo adulto normal existen siempre un número muy pequeño de elementos hematopoyéticos maduros. La literatura apoya que estas células son derivadas de células tallo circulantes que toman lugar y sufren diferenciación terminal o son elementos maduros circulantes que son atrapados dentro del bazo o muy probablemente una combinación

## Ontogenia de las HSCs

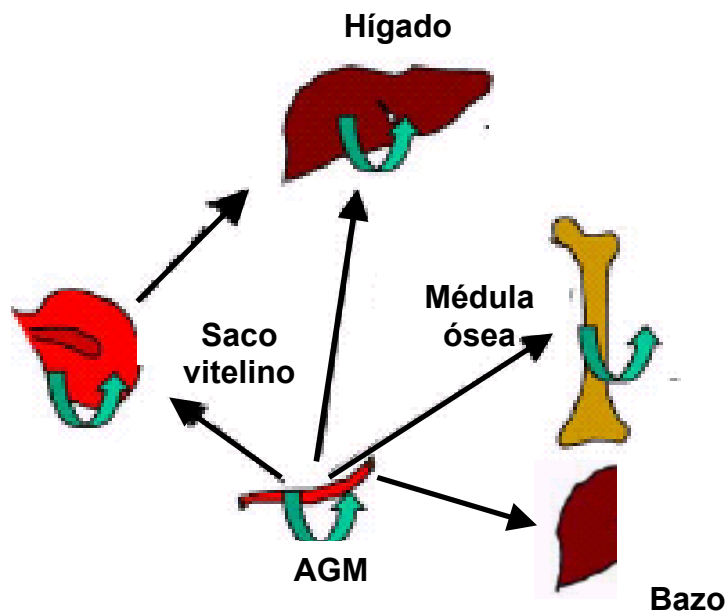


Figura 3. Ontogenia de las HSCs (células tallo hematopoyéticas). Las primeras HSCs capaces de colonizar la médula ósea adulta han sido identificadas en la región gonada-aorta-mesonefros (AGM) sin embargo no es claro si producen las HSCs definitivas de cualquier forma se considera que del saco vitelino las HSCs migran a otros órganos con actividad hematopoyética. Tomado y modificado de Bellantuono *et al.*, 2004.



de ambos eventos (**Freedman et al., 1981; O'Keane et al., 1989; Wilkins et al., 1994**). De esta manera el bazo es un órgano que puede participar activamente en la hematopoyesis llegando incluso a suplir las funciones de la médula ósea (**Williams et al., 1983**).

A partir de la onceava semana es cuando se establece la hematopoyesis medular. Después del nacimiento es el principal sitio definitivo hematopoyético para el individuo (**Charbord et al., 1996**). Durante los dos primeros años de vida la médula ósea activa (médula roja) se localiza en todos los huesos y gradualmente es reemplazada por tejido medular inactivo (médula amarilla). Dentro de los primeros cuatro años de vida la médula ósea de todos los huesos contribuye a la hematopoyesis (**Munker et al., 1998**), posteriormente en la vida adulta queda restringida a ciertos sitios como los huesos pélvicos, la columna vertebral, las regiones proximales del fémur y el húmero, el cráneo y el esternón (**Hughes-Jones & Wickaramasinghe, 1991**). En situaciones de necesidad o demanda hematopoyética se puede producir una expansión de la médula roja hacia la médula grasa o inclusive se lleva a cabo extramedularmente como en el bazo y el hígado (**Pluznick & Sachs, 1965; Weiss, 1977**).

La hematopoyesis que se lleva a cabo en el bazo e hígado refleja la propiedad de los tejidos hematopoyéticos inertes de volverse activos si son estimulados (**Nilsson & Bertoncello, 1994**). A este evento donde elementos de médula ósea benignos son encontrados en un número incrementado en órganos hematopoyéticos secundarios como el bazo se le conoce como hematopoyesis extramedular, lo cual también es referido como una metaplasia mieloide, este incremento es un índice de activación de la hematopoyesis extramedular (**O'Malley et al., 2005**).

## Microambiente hematopoyético y citocinas

En la cavidad de la médula ósea existe un ambiente particular que favorece la hematopoyesis y está constituido por distintos tipos de células estromales como: fibroblastos, células endoteliales, osteoblastos, adipositos y células accesorias (macrófagos, linfocitos y NK, llamados así por encontrarse de manera transitoria en el microambiente) (**Prosper & Verfaillie, 2001**), quienes a su vez secretan y expresan una gran cantidad de moléculas de la matriz extracelular (ECM, extracellular matrix) (colágeno I-VI, fibronectina, tenascina, laminina y proteoglicanos). Estos elementos en conjunto proveen un sistema de soporte estructural y funcional denominado microambiente hematopoyético en el cual las HSCs pueden mantener un estado de quiescencia, sufrir auto-renovación, diferenciación, maduración o apoptosis (**Short et al., 2003**). Las células tallo mesenquimales (MSCs, mesenchymal stem cells) son otro tipo de células que también residen en la cavidad ósea y se ha propuesto que dan origen a la mayoría de los linajes de células estromales incluyendo condrocitos, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, células endoteliales y monocitos, demostrado *in vitro* y parcialmente *in vivo* (**Wang et al., 2006, Mugurama et al., 2006**) (**Figura 4**). Las células estromales producen una serie de moléculas conocidas como **citocinas** y son las responsables de modular la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas hasta generar los diferentes tipos de células maduras: linaje mieloide (eritrocitos, megacariocitos, monocitos-macrófagos, granulocitos-neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y linaje linfoide (linfocitos T, B y NK) (**Cronkite & Feinendegen, 1976; Socolovsky et al., 1998; Metcalf, 1998; Broxmeyer & Kim, 1999; Kaushansky, 2006**). Por su efecto biológico y características moleculares se han dividido en factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias, interferones, interleucinas y quimiocinas (**Davis et al., 1996; Aguirre de Avalos, 2002**).

Microambiente hematopoyético

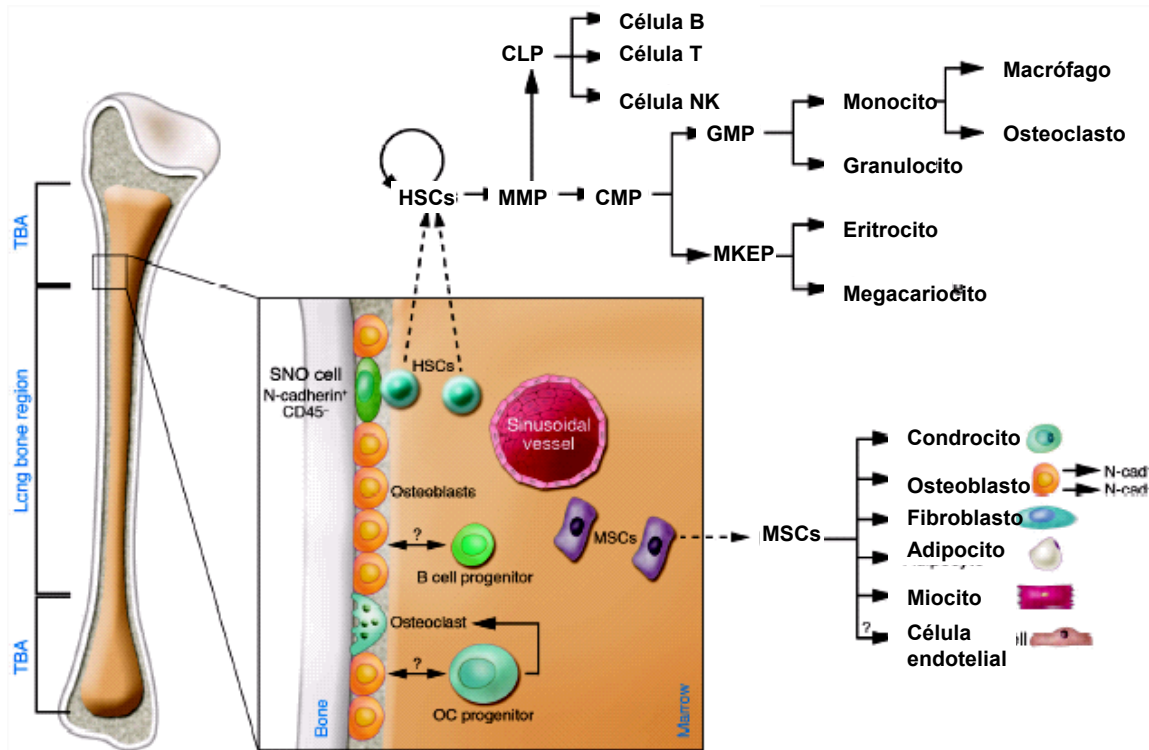


Figura 4. En la médula ósea las HSCs residen cerca de los osteoblastos sobre el nicho endosteal o adyacentes a las células endoteliales de las vesículas sinusoidales. Sobre cada división, una célula hija deja el hueso para proliferar y diferenciarse hacia varios linajes. Las HSCs y su progenie están rodeadas por células estromales derivadas de las células tallo mesenquimales (MSCs), quienes también residen en la cavidad ósea. Las MSCs dan origen a condrocitos, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, endotelio y miocitos. Tomado y modificado de Yin & Li, 2006.

Las citocinas, son moléculas de naturaleza proteica que actúan a través de la unión a receptores específicos de membrana activando una gran variedad de rutas de señalización implicadas en la proliferación, maduración, autorenovación o muerte celular. Estas moléculas presentan retro-regulaciones positivas y negativas entre sí y por lo general actúan en conjunto con otras citocinas, las cuales pueden ser producidas por la misma célula o células vecinas (**Sachs, 1996**). Los receptores de citocinas están estructuralmente y funcionalmente relacionados, y la activación de las moléculas Jak tirocinas cinasas parece ser el evento disparador en la señalización intracelular del receptor de citocinas llevando a la activación de varias rutas de señalización, evento conocido como transducción de señales, implicando a la vez proteínas de señalización tales como: factores de transcripción Stat, Shc, cinasas reguladoras de la señal extracelular (ERK), fosfatidilinositol 3-cinasa y la fosfolipasa C- $\gamma$ (PLC- ) (**Kovanen et al., 2000**). La integración de estos estímulos extracelulares e intracelulares a través de una compleja red de rutas reguladoras culmina en una respuesta general y la expresión de genes específicos.

Los cultivos *in vitro* del tejido hematopoyético, a largo plazo, han permitido establecer que la hematopoyesis se sostiene debido a que las células del estroma secretan diversas interleucinas (IL) tales como IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-7, IL-10, IL-13, entre otras (**Metcalf, 1998**). Por otra parte existen poco más de 20 reguladores hematopoyéticos solubles conocidos que llegan desde la circulación o actúan sobre células tallo en una manera parácrina, juxtacrina o autocrina. De estos, los factores estimuladores de colonias (CSFs, colony stimulating factors) han sido ampliamente estudiados y se ha mostrado que son esenciales para el desarrollo de los ocho tipos de células sanguíneas. Ellos incluyen al factor estimulador de colonias-macrófagos (M-CSF), el factor estimulador de colonias-granulocitos (G-CSF), el factor estimulador de colonias-granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor estimulador de colonias-multi mejor conocido como interleucina-3 (IL-3). Estos factores muestran un efecto pleiotropico ya que exhiben una amplia variedad de funciones biológicas sobre varios tejidos y células ejerciendo funciones similares sobre células específicas (**Barreda et al., 2004**). Para que los factores de crecimiento hematopoyéticos puedan ejercer sus efectos deben

unirse a receptores específicos sobre células blanco (**Matsui *et al.*, 1989; Pierce *et al.*, 1988; Rohrschneider & Metcalf, 1989; Sherr *et al.*, 1985**). La formación del complejo ligando receptor trae como consecuencia el desencadenamiento de señales intercelulares a través de la activación de tirocinas cinasas, dando como resultado final la activación celular y una determinada respuesta biológica. En general los CSFs median la sobrevivencia, proliferación, diferenciación y modulación funcional (quimiotaxis, degranulación, activación, adhesión, citotoxicidad, cambios del fenotipo a nivel RNAm) de varias poblaciones de células sanguíneas maduras y sus precursores (**Horiguchi *et al.*, 1987; Rappolee *et al.*, 1992; Bociek & Armitage, 1996; Alexander, 1998**).

## Caseínas y hematopoyesis

En años recientes se han reportado algunas moléculas con capacidad semejante a las citocinas, capaces de regular la hematopoyesis, como: el ácido all-transretinoico (ATRA), ampliamente utilizado en la leucemia granulocítica (**Fenaux et al., 2001**), derivados de las vitaminas D (**Abe et al., 1981; Dusso et al., 2005**) y E (**Cherdyntseva et al., 2005**), y algunos componentes de la leche bovina como por ejemplo la caseína (**Ramos et al., 2004**).

En los últimos 20 años el interés en la investigación ha sido enfocado en identificar componentes biológicamente activos, dentro de la leche bovina, que regulan al sistema inmune (**Wong and Watson, 1995**). La leche bovina contiene una gran cantidad de proteínas (caseínas,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, lactoferrina y lactoperoxidasa), dentro de las cuales las caseínas son las principales (75-80 %) (**Meisel, 1997**). La caseína, se encuentra en forma de micelas compuestas por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas  $\alpha$ -<sub>s1</sub>caseína,  $\alpha$ -<sub>s2</sub> caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína, insoluble en agua puede ser diluida en un álcali a pH 6.6 produciendo derivados solubles conocidos como caseinatos. El caseinato de sodio (**CasNa**) es obtenido disolviendo caseína en hidróxido de sodio y posteriormente la solución es sometida a una evaporación, con lo cual se obtiene un polvo blanco sin sabor, ni olor, soluble en agua y que además contiene un 65 % de proteínas. El CasNa muestra una excelente propiedad de unión al agua, es altamente soluble y puede ser dispersado rápidamente en mezclas acuosas y homogenizado en grasas o aceites, es estable al calor a pH 6.5 , puede fácilmente formar extensos enlaces hidrofóbicos resultando en un incremento de la cohesión intercadena (**Khwaldia et al., 2004**) Debido a su excelente valor nutricional es ampliamente utilizado en la industria alimenticia como fuente de proteínas en cereales y otros productos secos, especialmente en alimentos para bebés, productos dietéticos y para diabéticos (**Hall, 1971; Walstra & Jenner, 1984**).

La caseína durante mucho tiempo ha sido considerada una importante proteína en la dieta humana por lo que varios estudios resaltan su relevancia en la hematopoyesis. Desde hace varias décadas se sabe que en ratones, la privación de proteínas en su dieta, reduce la hematopoyesis, y esta es restaurada al ser alimentados con proteínas como la caseína (**Aschkenasy, 1968, 1971; Okano et al., 1992**). El caseinato de sodio (**CasNa**) o las caseínas son utilizadas para estudiar la reacción inflamatoria bajo condiciones controladas ya que en el sitio de inyección se favorece la acumulación de macrófagos y granulocitos, principales células implicadas en la inflamación. También se ha demostrado que ratones inyectados, vía intraperitoneal, con CasNa presentan en suero altas concentraciones de factores estimuladores de colonias como GM-CSF (**Pasotti et al., 1993; Metcal, 1996**) y de tipo G-CSF y M-CSF (**Lotem & Sachs, 1985**). Además la inyección de caseína subcutánea en ratones promueve una resistencia a la infección bacteriana, misma que es explicada por una reacción inflamatoria y un incremento de G-CSF pero no de TNF- $\alpha$  (**Noursadeghi et al., 2002**).

Nuestro grupo de investigación ha mostrado que el CasNa modula la diferenciación de las células 32D (una línea precursora hematopoyética, murina, dependiente de IL-3) hacia el linaje monocito-macrófago, **Ramos et al., 2000**) induciendo además la síntesis de M-CSF bioactivo y su receptor (c-fms) así como la proteína bioactiva de M-CSF (**Ramos et al., 2004, 2006 en preparación**); frena la proliferación de las células WEHI-3B (una línea leucémica mielomonocítica de ratón) (**Muñoz, 2005**); acelera la diferenciación de neutrófilos en banda a segmentados (**Bautista, 1998; Santiago et al., 2006 en preparación**); y por otro lado regula la proliferación de células mononucleadas de médula ósea normal de ratones BALB/c *in vitro* (**Lagunes et al., 2001**). La plétora de evidencia mencionada anteriormente nos hacen pensar que quizás el CasNa, una molécula que no pertenece a la familia de las citocinas, pueda actuar como un agente regulador de la hematopoyesis en un modelo *in vivo*.

## JUSTIFICACIÓN

El proceso de la hematopoyesis en médula ósea es regulado por una serie de moléculas conocidas como citocinas, particularmente por factores estimuladores de colonias (CSF), las cuales son responsables de modular la proliferación, diferenciación, auto-renovación y muerte (apoptosis) de las células hematopoyéticas **(Barreda et al., 2004)**.

Varios factores de crecimiento hematopoyético, miembros de la familia de las citocinas son empleados después de la quimioterapia o radioterapia en pacientes oncológicos para acelerar la recuperación de la hematopoyesis normal, no obstante también se ha reportado que tienen efectos negativos **(Komrokji et al., 2004; Ozer et al., 2000)** por lo que aún sigue vigente la necesidad de encontrar nuevas alternativas para inducir la recuperación de individuos mielosuprimidos sin afectar su salud.

Evidencias de nuestro laboratorio muestran que el CasNa puede regular la hematopoyesis *in vitro* pero falta mostrar si también lo hace *in vivo*. De corroborarse que también modula la hematopoyesis *in vivo* se abre la posibilidad para que en un futuro moléculas que no pertenecen a la familia de las citocinas como el CasNa puedan ser empleadas como importantes moduladores hematopoyéticos y de potencial biomédico como hoy lo son las citocinas.



## HIPÓTESIS

Se ha mostrado que el CasNa modula la proliferación y diferenciación de líneas de células normales y leucémicas de ratón así como de las células mononucleadas normales de médula ósea de ratón *in vitro*, en tanto que su inyección en ratones induce la acumulación de factores de crecimiento hematopoyético, por lo anterior, se espera que la administración de CasNa vía intraperitoneal a ratones inducirá la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas de médula ósea hacia el linaje mieloide y linfoide *in vivo*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

-Evaluar si la inyección de CasNa en ratones BALB/c induce la proliferación y diferenciación de células de médula ósea hacia el linaje mieloide y linfoide.

### **Objetivos particulares**

-Evaluar la inducción a la proliferación de las células hematopoyéticas de ratones BALB/c inyectados con CasNa.

-Evaluar la diferenciación de las células hematopoyéticas de ratones BALB/c inyectados con CasNa.

## MATERIAL Y MÉTODO

### TRATAMIENTO DE LOS RATONES Y OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS

Ratones hembra BALB/c [ n = 6, obtenidas del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Zaragoza] de 2-3 meses de edad, fueron mantenidas con alimento y agua en condiciones *ad libitum*. Como previamente lo había hecho Lagunes en el 2004, dos ratones fueron inyectadas vía intraperitoneal con 1 ml de CasNa (USB, Cleveland, Ohio USA) (0.1g/ml en agua milli-Q), dos más con sólo agua milli-Q (Veh) cada 48 horas durante 6 días y por otra parte también se utilizaron dos ratones sin tratamiento alguno para emplearlos como un control. Al séptimo día del tratamiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical obteniendo el fémur. La epífisis fue perforada haciendo fluir medio Iscove's (IMDM; Gibco BRL NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino, inactivado a 57° C, (SFB) (ver apéndice) (Gibco, USA), con la finalidad de extraer las células totales de médula ósea. Posteriormente se aislaron las células mononucleadas mediante un método de gradiente de densidad empleando Ficoll ( $\delta=1.077\text{g/ml}$ ) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo).

### EVALUACIÓN DEL NÚMERO Y VIABILIDAD CELULAR

Después de obtener las células mononucleadas se evaluó su número celular realizando un conteo en el hemocitómetro bajo el microscopio a 10 x . Para evaluar la viabilidad se utilizó una prueba de exclusión al azul tripano (Sigma, St Louis, Mo) la cual consistió en tomar una muestra de células adicionándoles el colorante en una proporción 1:1 enseguida se contaron las células vivas y muertas (teñidas con azul tripano, muertas por necrosis). Paralelamente se realizó un ensayo con el kit Annexin V-FITC (Biosource, USA) para evaluar una posible inducción a la apoptosis por alguno de los tratamientos empleados. La anexina es una proteína capaz de unirse a la

fosfatidilserina (FS) que solo se expone en la superficie de la membrana celular después que la célula ha iniciado un proceso de muerte celular programada (apoptosis), así de esta manera la identificación de la FS es empleada como un parámetro para evaluar apoptosis.

## **DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE MITOTICO**

Para determinar el índice mitótico (IM) se utilizaron ratones BALB/c inyectados con CasNa, agua milli-Q (Veh) o no tratados cada 48 h durante 6 días. Al 7 día fueron sacrificados por dislocación cervical extrayendo el fémur, sin embargo dos horas antes se les inyectó una solución de colchicina al 0.1 %. La epífisis fue perforada haciendo fluir una solución de cloruro de potasio (KCl) (0.046M) para obtener las células de médula ósea. Al término, las células fueron fijadas con una solución de ácido metanol-ácido acético (3:1) y lavadas con una solución de KCl 0.046M. El material genético fue expandido sobre laminillas mediante la técnica de goteo, enseguida fueron teñidas con colorante Giemsa (Sigma, México) y evaluadas contando 1000 células bajo el microscopio a 40 x identificando también las metafases presentes. Esta técnica permitió observar el porcentaje de células en división, reflejado por el IM, para evaluar la proliferación de las células de médula ósea.

## EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA

La incorporación de la timidina tritiada fue utilizada como un parámetro para evaluar el potencial proliferativo de las células de médula ósea. Para ello células mononucleadas, aisladas de ratones tratados o no con CasNa, fueron cultivadas en placas de 96 pozos (Corning, New York, USA) en medio líquido Iscove's (Gibco, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, USA) a una densidad de  $1 \times 10^5$  cél/ml en presencia o ausencia de interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3) (5ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Al quinto día de cultivo se adicionó a la placa  $1 \mu\text{Ci/ml}$  de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ ) [Thymidine (Methyl $^3\text{-H}$ ) KR AMTMANN, DF., México]. Después de adicionar la timidina se dejó incubar la placa durante 16 hrs. Terminado el tiempo se alternó una congelación y descongelación a  $-70^\circ \text{C}$  y  $37^\circ \text{C}$  en el ultracongelador y la incubadora respectivamente con el fin de lisar las células. Después de lavarlas y cosecharlas se evaluó la síntesis de DNA marcado, un parámetro para evaluar el potencial proliferativo, como cuentas por minuto (CPM) en un contador de emisiones  $\beta$  (Beckman LS 6500, USA). Esta técnica permite cuantificar la síntesis del DNA utilizando la emisión de partículas  $\beta$  por parte del nucleótido marcado, debido a que la timidina es capaz de incorporarse al DNA en la fase de síntesis. De esta manera es posible estimar la cantidad de DNA marcado que se está sintetizando y por lo tanto la proliferación celular.

## **ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (CFUs)**

Para evaluar el número de células precursoras en médula ósea. Las células mononucleadas aisladas de ratones inyectados con CasNa, agua milli-Q (VEH) o sin tratamiento fueron cultivadas en placas de 24 pozos (Corning, NY, USA) en un medio semisólido (Methocult; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada), el cual contenía un cóctel de factores de crecimiento, tales como: factor estimulador de células tallo recombinante humano (rmSCF), interleucina-3 recombinante murina (rmIL-3), interleucina-6 recombinante humana (rhIL-6) y eritropoyetina recombinante humana (rhEpo), a una densidad de  $3 \times 10^4$  cél/pozo. Al séptimo día de cultivo se evaluó el número de unidades formadoras de colonias (CFUs) mediante un conteo bajo el microscopio a 10 x.

## **MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS**

La morfología de las células mononucleadas fue evaluada después de realizar un citospin sobre laminillas, las cuales fueron fijadas con metanol al 90% y posteriormente teñidas con colorante Giemsa (Sigma, México). Para determinar la morfología se contaron 100 células bajo el microscopio, a 100x, con al menos tres repeticiones por experimento.

## **EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Otra manera de evaluar la proliferación y diferenciación fue analizando la expresión de antígenos de superficie, específicos para un determinado linaje hematopoyético, mediante el kit BrdU Flow (BD Pharmigen, San Diego, CA). Para lo cual ratones BALB/c, 2-3 meses de edad, fueron inyectados vía intraperitoneal cada 48 h durante 6 días con CasNa (0.1g/ml) o agua milli-Q (Veh) en volúmenes de 1 ml. Al séptimo día se les inyectó vía intraperitoneal 100  $\mu$ l de BrdU (10mg/ml) (BD Pharmigen, USA). Al octavo día los animales fueron sacrificados obteniendo las células de médula ósea, aislando después las células mononucleadas. Posteriormente las células se fijaron y marcaron con anticuerpos específicos contra poblaciones de granulocitos (anti-Ly-6G-PE) (Caltag Laboratories, USA), macrófagos (anti-F4/80-PE) (Caltag Laboratories, USA), linfocitos B (anti-B220-PE) (Caltag Laboratories, USA) y linfocitos T (anti-CD3-perCP) (Caltag Laboratories, USA). Finalmente se les adicionó un anticuerpo contra BrdU (anti-BrdU-FITC) (BD, Pharmigen, USA). La evaluación a la diferenciación hacia alguna de las poblaciones hematopoyéticas fue analizada mediante citometría de flujo.

## **MANEJO DE DATOS**

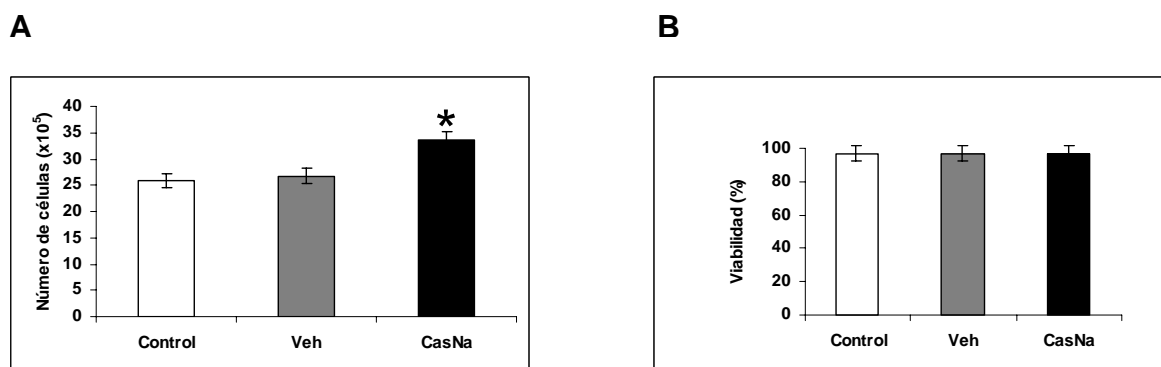
En el presente estudio se realizaron tres experimentos por separado. Los datos se presentaron como la media y la desviación estándar ( $\pm$ ). Para observar diferencias significativas entre los datos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de tukey ( $p < 0.05$ ) mediante el paquete estadístico SPSS.

## RESULTADOS

### El CasNa aumenta el número de células mononucleadas de médula ósea sin afectar su viabilidad.

Reportes *in vitro* indican que el CasNa modula la proliferación de células mononucleadas de médula ósea. Para evaluar si conserva la misma propiedad *in vivo*, ratones BALB/c de 2-3 meses de edad fueron inyectados vía intraperitoneal cada 48 h durante 6 días, con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), sólo agua milli-Q (Veh) o en su defecto no tratados. Al séptimo día los ratones fueron sacrificados obteniendo las células de médula ósea. Posteriormente se aislaron las células mononucleadas (MN) por un gradiente de densidad evaluando su número por conteo celular y su viabilidad mediante la técnica de exclusión al azul tripano.

Los resultados indican un aumento en el número de células mononucleadas provenientes de ratones tratados con CasNa en comparación con las células aisladas de aquellos ratones que sólo recibieron agua milli-Q (Veh) o que en su defecto no recibieron nada (**Figura 5 A**). Además los datos de viabilidad muestran que el CasNa no tiene algún efecto negativo sobre las células mostrando porcentajes de viabilidad arriba del 90% en las tres condiciones (**Figura 5 B**).

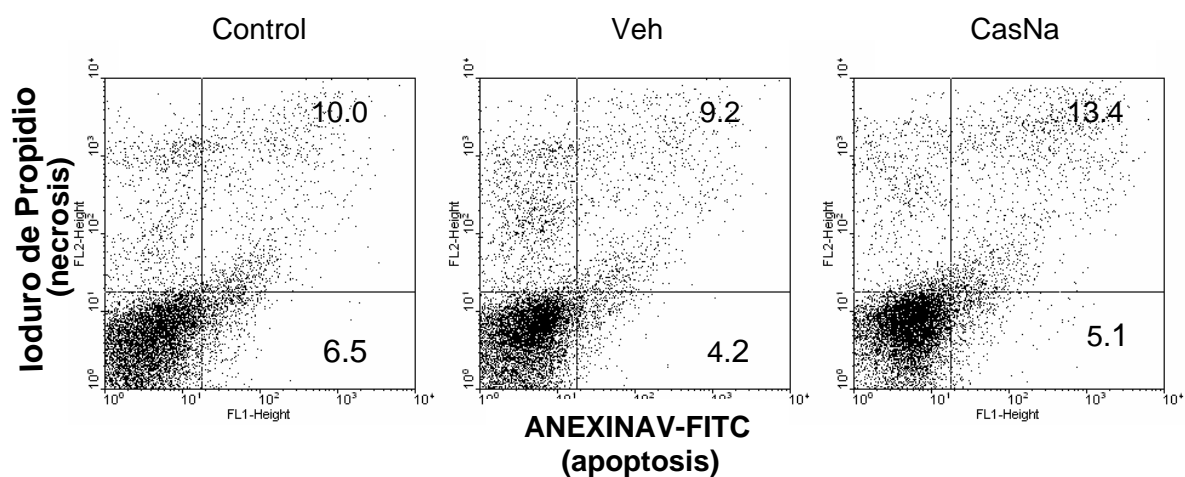


**Figura 5. Evaluación del número de células mononucleadas (A) y porcentaje de viabilidad (B). Control, ratones que no recibieron ningún tratamiento; Veh, ratones inyectados con agua milli-Q empleado como diluyente; CasNa, ratones inyectados con CasNa. \*Diferencia significativa con respecto al control y el Veh ( $P < 0.05$ ).**



**El CasNa no induce apoptosis en las células mononucleadas.**

Después de observar que el CasNa no tenía algún efecto necrótico sobre las células, se realizó un ensayo con el kit anexinaV-FITC para descartar una posible inducción a la apoptosis en las células mononucleadas provenientes de ratones con o sin tratamiento de CasNa. Los resultados analizados mediante citometría de flujo indican que el CasNa no está induciendo a la apoptosis a las células mononucleadas, independientemente del tratamiento, los valores obtenidos son similares (**Figura 6**).

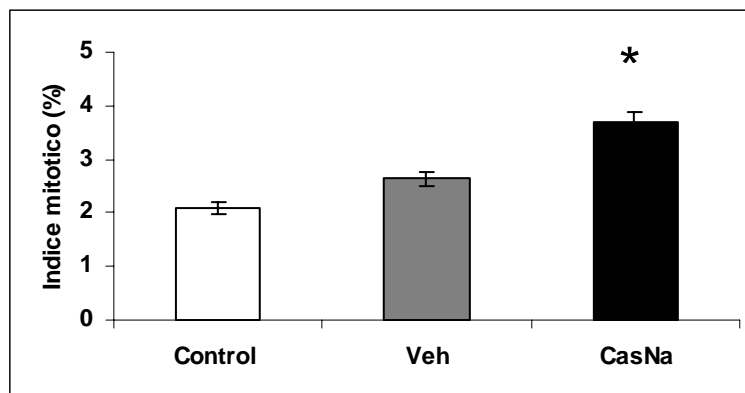


**Figura 6. Evaluación de apoptosis en células mononucleadas por el kit Anexina V-FITC. Control, ratones que no recibieron ningún tratamiento; Veh, ratones inyectados con agua milli-Q; CasNa, ratones inyectados con CasNa. \*Diferencia significativa con respecto al control y el Veh (P<0.05).**

**Células de médula ósea provenientes de ratones tratados con CasNa mostraron un mayor índice mitótico.**

Una vez que nos aseguramos que el CasNa aumentaba el número de células mononucleadas sin afectar la viabilidad por necrosis o apoptosis, procedimos a evaluar la proliferación de células de médula ósea mediante el índice mitótico (IM).

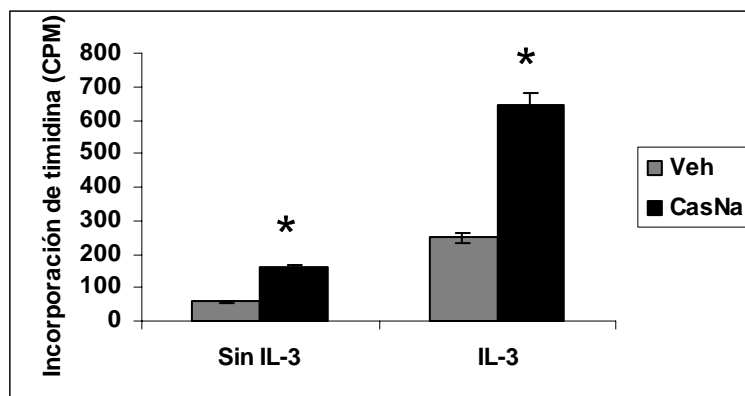
Ratones BALB/c fueron inyectados vía intraperitoneal cada 48 h durante 6 días con 1 ml de CasNa (0.1g/ml), sólo agua milli-Q (Veh) o en su defecto no tratados. Al séptimo día los ratones fueron sacrificados obteniendo las células de médula ósea. Al evaluar la presencia de células en metafase, con lo cual se determinó el índice mitótico (IM), en la población de células totales de médula ósea de ratones tratados o no con CasNa, los datos indican que las células provenientes de ratones tratados con CasNa presentan una mayor proporción de células en metafase reflejado por un mayor IM (**Figura 7**).



**Figura 7. Proliferación de células de médula ósea evaluada por el índice mitótico. \*Diferencia significativa con respecto al control y el Veh ( $p < 0.05$ ). Control, ratones que no recibieron ningún tratamiento; Veh, ratones inyectados con solución vehículo; CasNa, ratones inyectados con CasNa. \*Diferencia significativa con respecto al control y el Veh ( $P < 0.05$ ).**

### Mayor potencial proliferativo en células mononucleadas aisladas de ratones tratados con CasNa.

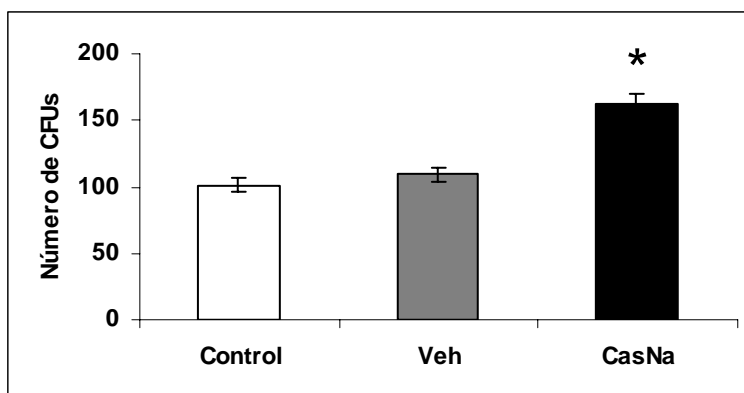
Para evaluar mediante otra técnica la proliferación de las células de médula ósea se realizó un cultivo *in vitro* de células mononucleadas, provenientes de ratones tratados o no con CasNa, en medio líquido Iscove's suplementado con suero fetal bovino al 10% a una densidad de  $1 \times 10^5$  cél/ml en presencia o ausencia de interleucina-3 recombinante de ratón (rmlL-3) (5ng/ml), durante 72 h. Al término del tiempo de cultivo la proliferación fue evaluada por incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ ) ( $1\mu\text{Ci/ml}$ ). Los datos muestran que las células aisladas de ratones tratados con CasNa en presencia o ausencia de IL-3 presentan una mayor incorporación de timidina tritiada, parámetro que indica un mayor potencial proliferativo (**Figura 8**). Después de realizar esta técnica concluimos que efectivamente el CasNa conserva la propiedad de estimular la proliferación de las células de médula ósea *in vivo*.



**Figura 8.** Evaluación del potencial proliferativo de las células mononucleadas, en presencia/ausencia de IL-3, mediante incorporación de timidina tritiada. Veh, ratones inyectados con solución vehículo; CasNa, ratones inyectados con CasNa. \*Diferencia significativa con respecto al VEH ( $P < 0.05$ ).

**El CasNa aumenta el número de células precursoras de médula ósea.**

Después de observar que las células provenientes de la médula ósea de ratones tratados con CasNa presentaban una mayor proliferación evaluada mediante conteo celular, índice mitótico e incorporación de timidina tritiada. Nosotros nos preguntamos si el aumento en la proliferación era consecuencia de un aumento en el número de unidades formadoras de colonias (CFUs). Para contestar la pregunta, las células mononucleadas aisladas de ratones tratados o no con CasNa fueron cultivadas en un medio semi-sólido (metilcelulosa), el cual contenía un cóctel de factores de crecimiento, durante 7 días a una densidad de  $3 \times 10^4$ /pozo. Al término del tiempo de cultivo se evaluaron bajo el microscopio las CFUs observándose un incremento en el número de células precursoras provenientes de ratones tratados con CasNa comparadas con las células provenientes de ratones tratados con agua milli-Q (Veh) o no tratados (**Figura 9**). De esta manera corroboramos que el CasNa interviene en la proliferación de las células de médula ósea mediante un incremento de células precursoras.



**Figura 9. Evaluación del número de unidades formadoras de colonias (CFUs). Control, ratones que no recibieron ningún tratamiento; Veh, ratones inyectados con agua milli-Q; CasNa, ratones inyectados con CasNa. \*Diferencia significativa con respecto al control y el VEH (P<0.05).**

**Células mononucleadas obtenidas de ratones tratados con CasNa presentan poblaciones celulares similares a las provenientes de ratones no tratados.**

Corroborada la capacidad del CasNa para estimular la proliferación de las células mononucleadas, evaluamos después una posible diferenciación analizando la morfología de las células mononucleadas de médula ósea provenientes de ratones tratados o no con CasNa, mediante conteos diferenciales. Cuando se evaluó la morfología no encontramos diferencias en el porcentaje de la población celular aún con el tratamiento con CasNa (**Tabla 1**), lo mismo se encontró al evaluar la morfología de la población de médula ósea total (datos no mostrados). Por lo que inferimos no hay inclinación hacia ningún linaje en particular.

	Linfocitos %	Neutrófilos % (banda)	Neutrófilos % (segmentados)	Eosinófilos %	Monocitos %	Blastos %
Control	11 ± 3.5	49 ± 1.4	22 ± 2.1	3 ± 1.4	6 ± 1.4	8 ± 1.4
Veh	11 ± 5.2	46 ± 3.36	26 ± 1.4	3 ± 1.1	7 ± 3.2	8 ± 4.6
CasNa	6 ± 3.8	44 ± 2.17	29 ± 1.05	5 ± 1	9 ± 2.5	6 ± 3.1

**Tabla 1. Morfología de células mononucleadas provenientes de ratones con diferentes tratamientos. \*Diferencia significativa respecto al control y Veh ( $p < 0.05$ ).**

**Células mononucleadas aisladas de ratones tratados con CasNa son inducidas para proliferar y diferenciarse hacia el linaje de macrófagos, granulocitos y linfocitos T.**

La evaluación de la morfología de las células MN obtenidas de ratones tratados con CasNa, mediante una tinción con Giemsa, mostró una tendencia hacia la diferenciación muy similar en las poblaciones hematopoyéticas evaluadas. Sin embargo para observar si el aumento en el número de células mononucleadas es consecuencia de una inducción acoplada a una diferenciación, ratones hembra BALB/c, 2-3 meses de edad, fueron inyectados vía intraperitoneal cada 48 h durante 6 días con 1 ml de CasNa (0.1g/ml) o agua milli-Q (Veh). Al séptimo día se les inyectó 100  $\mu$ l de BrdU (1mg/ml) vía intraperitoneal y al octavo día se sacrificaron los animales obteniendo las células totales de médula ósea. Posteriormente las células MN fueron aisladas mediante un gradiente de densidad y marcadas después con anticuerpos específicos contra poblaciones de granulocitos (anti-Ly-6G-PE), macrófagos (anti-F4/80-PE), linfocitos B (anti-B220-PE) y linfocitos T (anti-CD3-perCP). Finalmente se les adicionó un anticuerpo contra BrdU (anti-BrdU-FITC).

Los resultados analizados mediante citometría de flujo muestran que existe una mayor cantidad de células mononucleadas, aisladas de ratones tratados con CasNa, que proliferan y además se diferencian hacia poblaciones de granulocitos-macrófagos (**Figura 10 A**) y linfocitos T mientras que para la población de linfocitos B no se logró observar alguna diferencia con respecto al vehículo (**Figura 10 B**).

10 A)

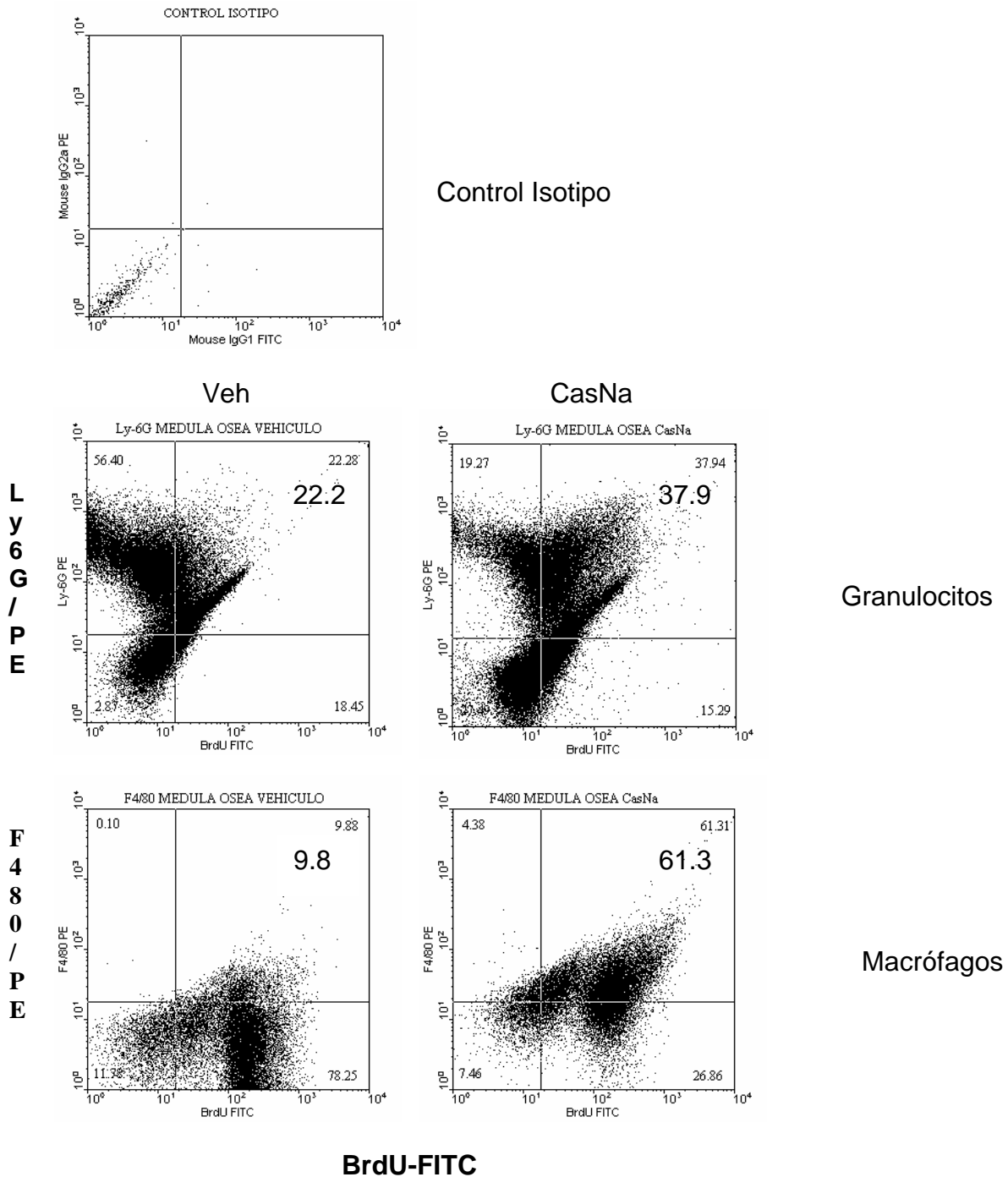


Figura 10 A. Evaluación de la proliferación y diferenciación de células mononucleadas, obtenidas de ratones tratados con o sin CasNa, hacia el linaje mieloide: granulocitos, macrófagos. Veh, ratones inyectados con agua milli-Q; CasNa, ratones inyectados con CasNa.

10 B)

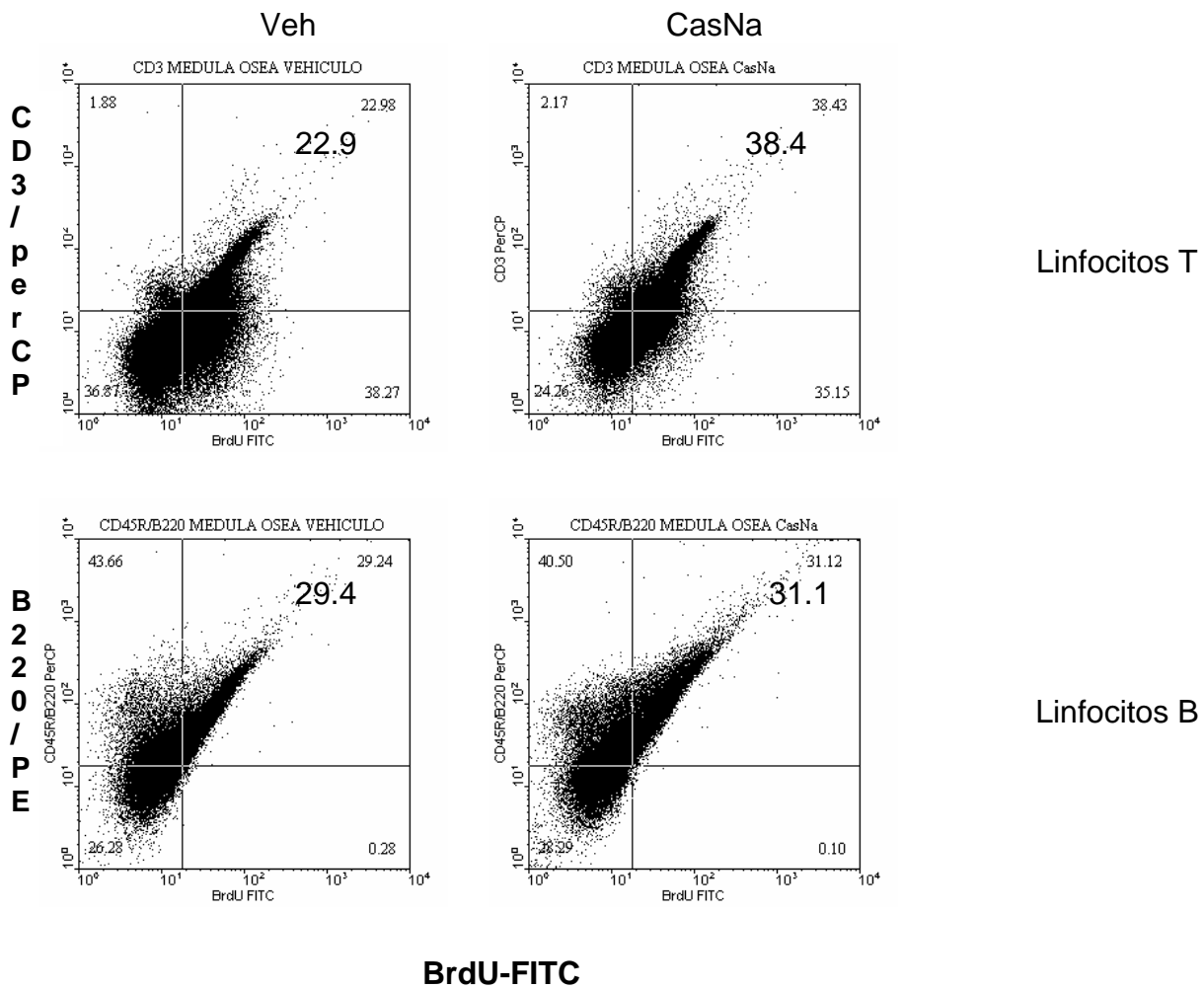


Figura 10 B. Evaluación de la proliferación y diferenciación de células mononucleadas, obtenidas de ratones tratados con o sin CasNa, hacia el linaje linfoide: linfocitos B y T. Veh, ratones inyectados con agua milli-Q; CasNa, ratones inyectados con CasNa.



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La hematopoyesis es un proceso que tiene lugar en la médula ósea (**Orkin, 1995**), y es sustentada gracias a la existencia de un microambiente propicio constituido por células estromales, quienes se encargan de producir una serie de moléculas llamadas citocinas. Estas moléculas a su vez se encargan de modular la proliferación, diferenciación, auto-renovación y muerte de las células sanguíneas (**Socolovsky et al., 1998; Broxmeyer and Kim, 1999; Kaushansky, 2006**).

Sin embargo se ha demostrado que las citocinas no son las únicas moléculas capaces de regular la hematopoyesis. Existen otras biomoléculas de origen natural, con capacidad semejante a las citocinas como: el ácido all-transretinoico (ATRA) (**Fenaux et al., 2001**), derivados de las vitaminas D (**Abe et al., 1981; Dusso et al., 2005**) y E (**Cherdyntseva et al., 2005**) y algunos componentes de la leche bovina como por ejemplo la caseína y el caseinato de sodio (CasNa) (**Ramos et al., 2004; Santiago 2006 en preparación**).

Nuestro grupo de investigación ha mostrado que el CasNa, una sal derivada de la caseína, modula la diferenciación de las células 32D (una línea precursora hematopoyética, murina, dependiente de IL-3) hacia el linaje monocito-macrófago (**Ramos et al., 2000**); acelera la diferenciación de neutrófilos en banda a segmentados (**Santiago et al., 1994, 2006**); y por otro lado regula la proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratones BALB/c *in vitro* (**Lagunes et al., 2001**).

Por otra parte se sabe que un aumento en el número de células mononucleadas en médula ósea indica la activación de la hematopoyesis *in vivo* (**Donahue, 1986**). El presente trabajo muestra que el CasNa, inyectado vía intraperitoneal a ratones BALB/c, durante 6 días, incrementa el número de células mononucleadas de médula ósea sin afectar su viabilidad o inducción a la apoptosis. La activación de la hematopoyesis *in vivo* fue corroborada al detectar que las células provenientes de ratones tratados con

CasNa presentan una mayor proporción de células en metafase, reflejado en un aumento en el índice mitótico, comparado con aquellas provenientes de ratones control y vehículo. El resultado anterior concuerda con experimentos de nuestro grupo en los cuales también ya se había observado un incremento en el número de células de médula ósea (**Lagunes, 2004; Martinez , 2006**).

El aumento del índice mitótico, se correlacionó con una mayor capacidad, de las células provenientes de ratones tratados con CasNa, para proliferar en presencia de interleucina-3 lo cual indica un mayor potencial proliferativo en comparación con el de las células provenientes de ratones que no recibieron nada o sólo una solución inyectable. Este aumento en la proliferación es consecuencia de un mayor número de unidades formadoras de colonias (CFUs) inducido por la acción del CasNa.

Al parecer, el CasNa, puede modular la proliferación de las células mononucleadas sin afectar su viabilidad por necrosis o apoptosis. Al realizar una tinción y revisar la morfología para detectar si las células que están proliferando además se estaban diferenciando hacia algún linaje en particular, observamos que las células mononucleadas no eran inducidas hacia un linaje hematopoyético en específico. Para confirmar este dato, evaluamos la incorporación de BromodeoxiUridina (BrdU), una técnica ampliamente utilizada para evaluar proliferación y diferenciación celular que utiliza anticuerpos contra antígenos específicos para diferentes tipos de células sanguíneas. Los datos de citometría de flujo revelan que el CasNa no sólo las promueve para proliferar sino que además las induce a diferenciarse hacia las poblaciones de granulocitos, monocito-macrófagos, los principales efectores de la respuesta inmune y la primer línea de defensa contra microorganismos (**Burg & Pillinger, 2001; Basset et al., 2003**); linfocitos T, quienes pueden producir un diverso grupo de citocinas implicadas en la regulación de la hematopoyesis tales como: interleucinas 3, 4, 5, 6, 13, 17 y GM-CSF (**Kelso et al., 1991; Fossiez et al., 1996; Migliaccio et al., 1988; Roboz & Rafii, 199; Sonoda et al., 1990; Lai et al., 1996; Greenberger et al., 1984**). Sin embargo para la población de linfocitos B los datos muestran sólo un ligero incremento en la proliferación. Nosotros pensamos que quizás

este efecto se deba a la migración de células precursoras de linfocitos B hacia el bazo o hacia el torrente sanguíneo por lo que en un futuro se debería realizar algún estudio sobre el efecto movilizador de células precursoras al exterior de la médula ósea.

Se sabe que la inyección intraperitoneal de CasNa, en ratones, eleva la concentración de factores de crecimiento estimuladores de colonias (**Lotem & Sachs, 1985; Metcalf, 1996**). Mientras que la adición de CasNa a cultivos de células normales como 32D estimula la liberación de TNF- $\alpha$  (**Ledesma, 2006**) y M-CSF (**Ramos *et al.*, 2004, 2006 en preparación**), todas, citocinas con reconocida actividad estimuladora de la hematopoyesis. Desconocemos el mecanismo por el cual el CasNa regula la proliferación y diferenciación de las células mononucleadas de médula ósea. Sin embargo una posible explicación, tomando en cuenta los datos anteriores, es que la molécula completa del CasNa posiblemente module la hematopoyesis estimulando la síntesis de este grupo de citocinas ya que se han reportado la existencia de receptores de caseína en granulocitos y macrófagos (**Lewis & Van epps, 1983; Hira *et al.*, 2003**). Otra posibilidad es que la molécula al degradarse libere algún péptido, similar a lo que ocurre cuando la caseína es degradada mediante una hidrólisis en el intestino (**Gill & Cross, 2000; Chabance *et al.*, 1998; Clare & Swaisgood, 2000; Kitts & Weiler, 2003**), el cual sea responsable de la activación de la hematopoyesis. No obstante aún faltan muchos estudios por realizar para establecer la ruta de activación del CasNa.

Es interesante resaltar que esta proteína de la leche este involucrada tanto en la respuesta inmune natural como la respuesta inmune específica sugiriendo que el CasNa puede tener un gran potencial para activar una respuesta inmune integral y aunque todavía no sabemos si tales células diferenciadas obtenidas de ratones inyectados con CasNa son funcionales existen algunos datos que sugieren que en efecto si lo sean. Estudios recientes con granulocitos-neutrófilos pre-tratados con caseína, empleados en una línea celular de melanoma, indican que la formación de tumores pueden ser disminuidos por la acción de los granulocitos (**Chen *et al.*, 2003**); experimentos con hidrolisado trípico de caseína en ratones muestran que la fagocitosis de las células fagocíticas sanguíneas es aumentada (**Kazlauskaite *et al.*, 2005**);

mientras que datos de nuestro grupo de trabajo indican que el CasNa acelera la conversión de neutrófilos en banda a segmentados (**Santiago, 1994, 2006**) además de inducir la síntesis de M-CSF bioactivo en la línea 32D mieloide multipotencial de ratón (**Ramos *et al.*, 2004**). El conjunto de datos anteriores muestran que las células diferenciadas obtenidas pueden ser funcionales debido a la acción de las caseínas.

Ahora bien, los anteriores estudios donde el CasNa está implicado en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas de médula ósea hacen pensar que quizás se deberían hacer estudios posteriores donde se emplee como un posible agente modulador implicado en la recuperación de pacientes mielosuprimidos o como un agente movilizador de células precursoras hacia el torrente sanguíneo. De ser así sería de gran interés estudiar otras posibles moléculas diferentes de las citocinas y en un futuro emplearlas como una terapia alterna en desordenes hematopoyéticos.

## CONCLUSIONES

La inyección de CasNa, vía intraperitoneal, durante 6 días a ratones BALB/c aumenta la proliferación de las células precursoras de médula ósea sin indicios de afectar su viabilidad por necrosis o apoptosis. Además las células mononucleadas son inducidas a diferenciarse hacia poblaciones de granulocitos, monocito-macrófagos y linfocitos T.

## PERSPECTIVAS

En la actualidad algunas citocinas son empleadas para movilizar células precursoras de médula ósea hacia el torrente sanguíneo para después emplearlas en el trasplante de médula ósea sin embargo el costo de este método es muy elevado. En el presente trabajo mostramos que el CasNa es capaz de aumentar el número de células precursoras de médula ósea *in vivo*, por lo que sería interesante mostrar que también las moviliza al torrente sanguíneo, de ser así, existe la posibilidad de que en el futuro sea utilizado como un movilizador de precursores sanguíneos para trasplante de médula ósea de bajo costo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S, and Suda T. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by  $1\alpha, 25$ - dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; 78: 4990–4994.

Abkowitz JL, Catlin SN, McCallie MT, Gutter P. Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. Blood. 2002; 100: 2665-2667.

Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. Immunity. 2001; 15: 659-69.

Aguirre de Ávalos M, Quintana R, Brandan N. Citoquinas. Cátedra de Bioquímica. UNNE. 2002: pp 1-19.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature. 2000; 404: 193-197.

Alexander WS. Cytokines in hematopoyésis. Int Rev Immunol. 1998; 16: 651-682.

Aschkenasy A. [Influence of certain antimetabolites (aminopterine, 6-mercaptopurine, prednisolone and chloramphenicol) on the restoration of lymphopoeisis after an experimental nitrogen inanition]C R Seances Soc Biol Fil. 1968; 162: 652-657.

Aschkenasy A. [Comparative effects of casein and various mixtures of amino-acids on the restoration of erythropoiesis, neutropoiesis and lymphopoiesis in rats prepared by a prolonged protein deprivation. New studies] Arch Sci Physiol. 1971;25: 415-430.

Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. Dev Comp Immunol. 2004; 28: 509-554.

Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*. 2003; 21 Suppl 2:S12-23.

Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 2804-2808.

Bautista M. Efecto de factores activadores y diferenciadores sobre el granulocito-neutrófilo en banda: Diferenciación, fragmentación del ADN y producción de M-CSF. Tesis Licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM. 1998.

Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 607-620. Review.

Bociek RG, Armitage JO. Hematopoietic growth factors. *CA Cancer J Clin*. 1996; 46: 165-184.

Broxmeyer H, Kim C. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol*. 1999; 27: 1113-1123.

Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol*. 2001; 99: 7-17.

Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jolles P, Fiat AM. Casein peptide release and passage to the blood during digestion of milk or yogurt. *Biochimie*. 1998; 80: 155-165.

Charbord P, Tavian M, Humeau L, Peault B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: and immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood*. 1996; 87: 4109-4119.



Chen YL, Chen SH, Wang JY, Yang BC. Fas Ligand on tumor cells mediates inactivation of neutrophils. *J Immunol.* 2003; 171: 1183-1191.

Cherdyntseva N, Shishkina A, Butorin I, Murase H, Gervas P, Kagiya TV. Effect of tocopherol-monoglucoside (TMG), a water-soluble glycosylated derivate of vitamin E, on hematopoietic recovery in irradiated mice. *J Radiat Res.* 2005; 46: 37-41.

Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci.* 2000; 83: 1187-1195.

Cronkite EP, Feinendegen LE. Notions about human stem cells. *Nouv Rev Fr Hematol Blood Cells.* 1976; 17: 269-284.

Davis W, Brown W, Wood P. Overview of the first International Symposium on Cytokines and Type I Type II Paradigm convened in Cairns, Australia, Oct, 1996. *Vet. Immunol and Immunopathol.* 1996; 63: 121-123.

Domen J, Weissman IL. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today.* 1999; 5: 201-208.

Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Sehgal PK, Nathan DG, Clarck SC. Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature.* 1986; 321: 872-875.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289: F8-F28.

Fenaux P, Chomienne C, Degos L. All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2001; 38: 13-25.

Fossiez F, Djossou O, Chomarar P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T-cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med.* 1996; 183: 2593-2603.

Freedman MH, Saunders EF. Hematopoiesis in the human spleen. *Am J Hematol.* 1981;11: 271-275.

Gill HS, Doull F, Cross ML. Immunoregulatory peptides in milk. *Br J Nutr.* 2000; 84: (S1): 111-117.

Gordon MY, Lewis JL, Marley SB. Of mice and men...and elephants. *Blood.* 2002; 100:4679-4680.

Greenberger JS, Krensky AM, Messner H, Burakoff SJ, Wandl U, Sakakeeny MA. Production of colony-stimulating factor(s) for granulocyte-macrophage and multipotential (granulocyte/erythroid/megakaryocyte/macrophage) hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM) by clonal lines of human IL-2-dependent T-lymphocytes. *Exp Hematol.* 1984; 12: 720-727.

Hall C. *Drying of milk and products.* 2da edition. The Avi Publiding Company Inc. USA. 1971: pp 185-186.

Hao Q, Thiermn F, Peterse D. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood.* 1996; 88: 3306-3313.

Hao QL, Zhu J, Price MA, Payne KJ, Barsky LW, Crooks GM. Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood.* 2001; 97: 3683-3690.

Hira T, Hara H, Tomita F, Aoyama Y. Casein binds to the cell membrane and induces intracellular calcium signals in the enteroendocrine cell: a brief communication. *Exp Biol Med.* 2003; 228: 850-854.

Horiguchi J, Warren MK, Kufe D. Expression of the macrophage specific colony-stimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1987; 69: 1259-1261.

Hughes-Jones NC, Wickramasinghe E. Lecture notes on haematology. Blackwell Scientific Publications, London. 1991: pp 225.

Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 10716-10721.

Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2034-2045.

Kazlauskaite J, Biziulevicius GA, Zukaite V, Biziuleviciene G, Miliukiene V, Siaurys A. Oral tryptic casein hydrolysate enhances phagocytosis by mouse peritoneal and blood phagocytic cells but fails to prevent induced inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2005; 5: 1936-1944.

Kelso A, Troutt AB, Maraskovsky E, Gough NM, Morris L, Pech MH, Thomson JA. Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated in vivo and in vitro. *Immunol Rev.* 1991; 123: 85-114.

Khwaldia K, Banon S, Perez C, Desobry S. Properties of Sodium Caseinate Film-Forming Dispersions and Films. Properties of sodium caseinate film-forming dispersions and films. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 2011-2016.

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005; 121: 1109-1121.

Kitts DD, Weiler KL. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des.* 2003; 9: 1309-1323.

Komrokji RS, Lyman GH. The colony-stimulating factors: use to prevent and treat neutropenia and its complications. *Expert Opin Biol Ther.* 2004; 4: 1897-1910.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997;91:661-672.

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.

Kovanen PE, Junttila I, Takaluoma K, Saharinen P, Valmu L, Li W, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 tyrosine kinase by protein kinase C during macrophage differentiation of IL-3-dependent myeloid progenitor cells. *Blood.* 2000; 95: 1626-1632.

Lagunes H, Ramos MG, Galvan QA, Ledesma ME, Weiss SB, Santiago OE. Efecto del CasNa en la proliferación y viabilidad de células leucémicas y células mononucleadas de médula ósea. *Rev. Biomédica.* 2001; 12: Suplemento 1, S33.

Lagunes H. Estimulación de la hematopoyésis médular y extramedular inducida por el caseinato de sodio (CasNa) en ratones BALB/c. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. 2004.

Lai YH, Heslan JM, Poppema S, Elliot JF, Mosmann TR. Continuous administration of IL-13 to mice induces extramedullary hemopoiesis and monocytosis. *J Immunol.* 1996; 156: 3166-3173.

Larsson J, Karlsson S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene.* 2005; 24: 5676-5692 .

Ledesma E. Participación de inhibidores hematopoyéticos en el bloqueo de la proliferación de la línea celular mieloide multipotencial 32D de ratón tratada con caseinato de sodio (CasNa). Tesis de Maestría, FES-Zaragoza, UNAM. 2006.

Lewis SL, Van Epss DE. Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation*. 1983; 7: 363-375.

Lipschitz DA, Udupa KB, Milton KY, Thompson CO. Effect of age on hematopoiesis in man. *Blood*. 1984;63 : 502-509.

Lotem J, and Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer*. 1985; 35: 93-100.

Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 938: 167-173.

Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 11872-11877.

Martinez N. Estudio de la proliferación in vivo de células hematopoyéticas de médula ósea en ratones inyectados con caseinato de sodio (CasNa). Tesis de Licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM. 2006.

Matsui T, Pierce JH, Fleming TP, Greenberger JS, LaRoche WJ, Ruggiero M, Aaronson SA. Independent expression of human alpha or beta platelet-derived growth factor receptor cDNAs in a naive hematopoietic cell leads to functional coupling with mitogenic and chemotactic signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86: 8314-8.

Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. Arch Med Res. 2003; 34: 3-15.

McGrath KE, Palis J. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. Exp Hematol. 2005; 33: 1021-1028.

McKenzie SB. Hematología clínica. Ed. El Manual Moderno, México. 1991:pp 523.

Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, Dzierzak EA. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. Nature. 1993; 364: 64-67.

Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. Biopolymers. 1997; 43: 119-128.

Metcalf D. Cell-cell signalling in the regulation of blood cell formation and function. Immunol Cell Biol. 1998; 76: 441-447.

Metcalf D, Robb L, Dunn AR, Mifsud S, Di Rago L. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. Blood 1996; 88: 3755-3764.

Miales JB. Hematología Médica de Laboratorio. Editorial Reverte, España. 1985: pp 115-123.

Migliaccio G, Migliaccio AR, Viserr JW. Synergism between erythropoietin and interleukin-3 in the induction of hematopoietic stem cell proliferation and erythroid burst colony formation. Blood. 1988; 72: 944-951.

Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity. 1994;1: 661-73.

Munker R, Hiller E, Paquette R. Modern Hematology. Biology and clinical management. Ed. Human Press, New Jersey. 1998: pp 369.

Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006; 107:1878-1887.

Muñoz L. Estudio del efecto de péptidos de Caseína en la proliferación y diferenciación de células 32D y WEHI-3. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM. 2005.

Na Nakorn T, Traver D, Weissman IL, Akashi K. Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *J Clin Invest*. 2002; 109: 1527-1528.

Nilsson SK, Bertonecello I. Age-related changes in extramedullary hematopoiesis in the spleen of normal and perturbed osteopetrotic (op/op) mice. *Exp Hematol*. 1994; 22: 377-83.

Noursadeghi M, Bickerstaff 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.

Okano M, Ohnota H, Sasaki R. Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J Nutr*. 1992 ;122: 1376-1383.

O'Keane JC, Wolf BC, Neiman RS. The pathogenesis of splenic extramedullary hematopoiesis in metastatic carcinoma. *Cancer*. 1989; 63: 1539-1543.

O'Malley DP, Kim YS, Perkins S, Baldrige LA, Juliar BE, Orazi A. Morphologic and immunohistochemical evaluation of splenic hematopoietic proliferations in neoplastic and benign disorders. *Modern Pathology*. 2005; 18: 1550-1561.

Orkin SH. Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem*. 1995; 270: 4955-4958.

Orlic D, Bodine DM. What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood*. 1994; 84: 3991-3994.

Osawa M, Hanada K, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996; 273: 242-245.

Owaga M, Matsunaga T. Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 872: 17-23.

Ozer H, Armitage JO, Bennett CL, Crawford J, Demeti GD, Pizzo PA, Schiffer CA, Smith TJ, Somlo G, Wade JC, Wade JL 3rd, Winn RJ, Wozniak AJ, Somerfield MR. ; American Society of Clinical . 2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel. *Oncology. J Clin Oncol*. 2000; 18: 3558-3585.

Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med*. 2005; 202: 1599-1611.

Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo GM, Ricevuti G. The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol*. 1993; 15: 71-81.

Pierce JH, Ruggiero M, Fleming TP, Di Fiore PP, Greenberger JS, Varticovski L, Schlessinger J, Rovera G, Aaronson SA. Signal transduction through the EGF receptor transfected in IL-3-dependent hematopoietic cells. *Science*. 1988 ; 239: 628-631.

Pluznick D, Sachs L. The cloning of normal mast cells in the tissue culture. *J Cell Physiol*. 1965; 66: 319-324.

Prosper F, Verfaillie CM. Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leukoc Biol*. 2001; 69: 307-316.



Ramos G, Santiago E, Martínez I, Zambrano I, Manrique B, Weiss B. El caseinato de sodio (CasNa) induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D. *Rev Invest Clin.* 2000; 52: 638-644.

Ramos G, Weiss B, Córdova Y, Hernández J, Zambrano I, Santiago E. Sodium caseinate induces the murine multipotent myeloid cell line 32D to express and secrete the macrophage colony stimulating factor (M-CSF). *Arch Med Res.* 2004; 35: 109-113.

Ramos G, Weiss B, Melo B, Córdova Y, Ledesma E, Muñoz L, Sánchez L, García A, Santiago-Osorio E. Alpha, beta and kappa caseins inhibit the proliferation of the myeloid cell lines 32Dcl3 and WEHI-3 and exhibit different differentiation properties. *Life Sciences.* 2006. (en preparación).

Rappolee DA, Werb Z. Macrophage-derived growth factors In: Russell SW, Gordon S, editors. *Current topics in microbiology and immunology 181-macrophage biology and activation*, Berlin: Springer; 1992: 87-140.

Roboz GJ, Rafii S. Interleukin-5 and the regulation of eosinophil production. *Curr Opin Hematol.* 1999; 6: 164-168.

Rohrschneider LR, Metcalf D. Induction of macrophage colony-stimulating factor-dependent growth and differentiation after introduction of the murine c-fms gene into FDC-P1 cells. *Mol Cell Biol.* 1989; 9: 5081-5092.

Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol.* 2005; 33: 131-143.

Sachs L. The control of haematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93: 4742-4749.

Santiago E, Mora L, Montesinos J, Ventura J, Macuca C, Mendoza J. Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblast. *Rev Invest Clin.* 1994; Supl-1: 253

Santiago-Osorio E, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Monroy A, Sánchez L, Weiss-Steider B. Sodium caseinate induce to neutrophil to secrete macrophage colony-stimulating factor. *Ach Med Res.* 2006. (en preparación).

Sherr CJ, Rettenmier CW, Sacca R, Roussel MF, Look AT, Stanley ER. The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell.* 1985; 41: 665-676.

Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res.* 2003; 34: 565-571.

Socolovsky M, Constantinescu S, Bergelson S, Sirotkin A, Lodish H. Cytokines in hematopoiesis: specificity and redundancy in receptor function. *Adv Protein Chem.* 1998; 52: 141-198.

Sonoda Y, Okuda T, Yokota S, Maekawa T, Shizumi Y, Nishigaki H, Misawa S, Fujii H, Abe T. Actions of human interleukin-4/B-cell stimulatory factor-1 on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic progenitor cells in culture. *Blood.* 1990; 75: 1615-1621.

Spangrude GJ, Heimfield S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988; 241: 58-62.

Takeuchi M, Sekiguchi T, Hara T, Kinoshita T, Miyajima A. Cultivation of aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances engraftment to the bone marrow. *Blood.* 2002; 99: 1190-1996.

Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science*. 2000; 290: 2152-2154.

Toles JF, Chui DH, Belbeck LW, Starr E, Barker JE. Hemopoietic stem cells in murine embryonic yolk sac and peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1989: 7456-7459.

Walstra P, Jenner R. Dairy chemistry and physics. Ed. John Wiley Sons, New York, USA. 1984: pp 106.

Wang X, Hisha H, Taketani S, Adachi Y, Li Q, Cui W, Cui Y, Wang J, Song C, Mizokami T, Okazaki S, Li Q, Fan T, Fan H, Lian Z, Gershwin ME, Ikehara S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells*. 2006 ; 24: 482-493.

Weiss L. The blood cells and hematopoietic tissues. McGraw Hill, N.Y. 1977;pp 96.

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000a; 100:157-168.

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000b; 287: 1442-1446.

Williams JW, Beutler E, Erslev AJ, Rundles WR. Hematologia. Salvat Ed. 2ª. Edición. Tomo 1. España. 1983: pp 61.

Wilkins BS, Green A, Wild AE, Jones DB. Extramedullary haemopoiesis in fetal and adult human spleen: a quantitative immunohistological study. *Histopathology*. 1994;24: 241-247.

Wong CW, Watson DL. Immunomodulatory effects of dietary whey proteins in mice. *J Dairy Res*. 1995; 62: 359-368.

Yin T, Li L The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1195-1201.

Zambrano IR, Santiago E, Weiss B, Cáceres JR. Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev Inv Clin.* 1999; 51: 53-66.

## APÉNDICE

### Inactivación del suero fetal bovino

El suero fetal bovino (SFB) se descongeló a temperatura ambiente, posteriormente fue sometido a un calentamiento, en baño maría a 57°C durante treinta minutos, con el propósito de inactivar las proteínas del complemento. Las alícuotas, después de enfriarse a temperatura ambiente, se refrigeraron a 4°C para una manipulación constante.

### Medio Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM)

Se disuelve un sobre de Iscove's (17.7g aproximadamente) (Gibco, USA) y Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 3.024g/L en un Litro de agua bidestilada (Agua Milli-Q). Una vez preparada la solución, esta es filtrada mediante una membrana (tamaño de poro 0.22 $\mu\text{m}$ , diámetro 47mm; Millipore). Al término se adiciona el antibiótico 1ml/L (Penicilina-Estreptomicina) y las alícuotas son refrigeradas a 4°C.

### Interleucina-3 recombinante murina (rIL-3)

Se pesan 10 mg de albúmina y se disuelven en 10 ml de PBS. Enseguida la solución se filtra mediante una membrana (tamaño de poro 0.22 $\mu\text{m}$ , diámetro 25mm). A continuación se toman 100  $\mu\text{l}$  de interleucina y se diluyen en los 10 ml de la solución filtrada. Posteriormente se toman alícuotas de 1 ml en eppendorf estériles y se refrigeran a -20°C.