

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL CANCER

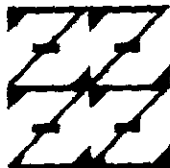
PAPEL DEL CASEINATO DE SODIO EN LA INDUCCION DE LA DIFERENCIACION DE LA LINEA MIELOIDE HEMATOPOYETICA PRIMITIVA 32D

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOL O G O PRESENTA :

GERARDO RAMOS MANDUJANO

UNAM FES ZARAGOZA



LO DEMANDA LA LEY DE NUESTRA COLECCION

DIRECTOR: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MEXICO, D. F.

27 7962

MARZO DE 1999

TESIS CON

VALIA DE ORIGEN



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

TITULO DE LA TESIS

**PAPEL DEL CASEINATO DE SODIO EN LA INDUCCION DE LA
DIFERENCIACION DE LA LINEA MIELOIDE HEMATOPOYETICA
PRIMITIVA 32D**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y
MOLECULAR DEL CANCER, UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION
CELULAR Y CANCER, FES-ZARAGOZA, UNAM.
BAJO LA DIRECCION DEL Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO**

MIEMBROS DEL JURADO:

**Dr. BENNY WEISS STEIDER
Dra. Ma. de LOURDES MORA GARCIA
M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA
M. en C. LUIS SANCHEZ SANCHEZ**

**DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO SE CONTO CON EL APOYO ECONOMICO DE
BECA PARA TESIS DE LICENCIATURA "FUNDACIÓN UNAM".**

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO CON EL APOYO DE LA DGAPA, UNAM PAPIIT IN213397.

INDICE

RESUMEN	1
MARCO TEORICO	2
HEMATOPOYESIS	2
Células hematopoyéticas progenitoras y multipotenciales	3
Factores de crecimiento hematopoyético (FCII's)	5
Líneas mieloides multipotenciales	8
Diferenciación monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo	9
Moléculas diferenciadoras distintas a los FCII's	15
DERIVADOS DE LA CASEINA	17
Péptidos provenientes de las proteínas de la leche	18
Efectos biológicos de los péptidos derivados de las caseínas	18
Receptores opioides en el sistema inmune	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
HIPOTESIS	24
OBJETIVO	25
MATERIAL Y METODOS	26
RESULTADOS	29
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42
APENDICE	48

**A mis padres
y
A mis hermanos**

Especialmente a Alejandro, Simón y Patricia.
Por todo su apoyo, y agradeciéndoles el respeto y la confianza brindada
para alcanzar mis metas.

A Beatriz

Que se ha convertido en mi principal razón de seguir adelante

Para Andrés, Ma. de Jesus y Selene

Quienes me han impulsado durante toda la carrera

AGRADECIMIENTOS

Especialmente al Dr. Edelmiro Santiago Osorio, que este objetivo es producto de su confianza y la enseñanza brindada en mi estancia en el laboratorio, y a Ignacio Martínez. Espero nuestras metas crezcan en todo sentido.

A los Drs. Benny Weiss Steider e Issac Rodrigo Zambrano y al M. en C. Luis Sánchez Sánchez, por todas sus aportaciones al trabajo realizado en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Molecular del Cáncer

De igual forma a mis compañeros del laboratorio

A todos ellos, gracias.

RESUMEN

El proceso de diferenciación de las células hematopoyéticas involucra moléculas glicoproteicas conocidas como factores de crecimiento hematopoyético (FCH's), quienes inducen a las células primitivas para generar células sanguíneas diferenciadas capaces de cumplir su función en el organismo. Sin embargo se ha observado que moléculas distintas a los FCH's también activan la diferenciación mieloide.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la diferenciación de la línea hematopoyética mieloide primitiva 32D expuesta al caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína. Por conteo celular se observó que el CasNa es capaz de inhibir la proliferación en forma dosis-dependiente, con un 60 % como máximo de inhibición a concentraciones cercanas a 1 mg/ml. La tinción con giemsa de estas células revela la presencia de monocitocitofagos hasta en un 30% de la población, la cual fue confirmada con una tinción citoquímica específica para el linaje monocítico (α -naftil acetato esterasa). Al evaluar la capacidad microbicida de estas células, a través de la reducción de nitroazul de tretazolio (NBT), como un parámetro de diferenciación funcional, sólo algunas células fueron positivas. Estos datos sugieren que la diferenciación inducida por el CasNa es parcial.

También se muestra que otros derivados de la caseína; caseína, β -caseína y 1-5- β -casomorfina, tienen un efecto similar al CasNa sobre las células 32D. La actividad similar entre el CasNa y el péptido 1-5- β -casomorfina, un derivado de la degradación enzimática de la β -caseína, hacen pensar que el CasNa tiene la misma ruta de activación que la casomorfina.

MARCO TEORICO

Hematopoyesis

Las células sanguíneas tienen dos principales funciones, los eritrocitos se encargan del transporte de oxígeno y los leucocitos de la defensa del organismo contra la invasión de agentes patógenos y de células propias transformadas. Muchas de ellas mueren en cumplimiento de su función, por lo que existe la necesidad de un constante suministro de nuevas células. La escala de este re-emplazamiento es asombrosamente grande, en el adulto cerca de 3×10^6 células rojas llegan al final de su vida cada segundo e igualmente pasa con un número menor de leucocitos, aunque en situaciones como anoxia o infección se requiere un rápido y significativo incremento en la producción de células maduras (Whetton y Dexter, 1989).

La producción de células sanguíneas conocida como hematopoyesis, se observa en el ratón a los 7 días de gestación (Medvinsky *et al*, 1993), a pesar de aceptarse que inicia en los islotes sanguíneos del saco vitelino, algunos estudios involucran al sitio aorta/gónada/mesonefro (AGM) como iniciador de esta actividad (Morrison *et al*, 1995). Experimentos con marcadores celulares muestran que las células hematopoyéticas del saco vitelino son "sembradas" en los órganos embrionarios mieloides y linfoides, pasando la actividad hematopoyética del saco vitelino al timo e hígado (Toles *et al*, 1989) y de éste al bazo (Godin *et al* 1993) y finalmente a la médula ósea (Morrison *et al*, 1995).

Las células responsables de sostener la hematopoyesis son conocidas como células tallo hematopoyéticas (CTH). Estas células se caracterizan por su capacidad de autorenovación y comprometimiento hacia los diferentes linajes celulares sanguíneos. En la vida adulta se concentran principalmente en el estroma de la médula ósea y constituyen el 0.05% de esta población celular tanto en el ratón como humano. También tienen la

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

Células hematopoyéticas progenitoras y multipotenciales

La existencia de las células progenitoras hematopoyéticas, fue evidenciada al descubrir que los ratones irradiados letalmente sobrevivían después de la inyección de células de médula ósea de ratones singénicos sanos. Las células inyectadas formaban focos de proliferación en el bazo de los ratones recuperados después de 8 días, cada foco fue resultado de la multiplicación de una sola célula progenitora, quien dió origen tanto al linaje mieloide como al linfoide. La proliferación de varias de ellas permitió la reconstitución del tejido hematopoyético de los ratones transplantados (Gordon *et al* 1985). A estas células, capaces de dar origen a un nódulo de proliferación a corto plazo, se les llamó unidad formadora de colonias de bazo (UFC-B). Adicionalmente, cultivos *in vitro* de células de médula ósea de ratón por 7 días también desarrollaron colonias mixtas de células hematopoyéticas, lo cual confirma la existencia de la UFC-B y refuerza la idea de que en la médula ósea existen células progenitoras con la capacidad de reconstituir la hematopoyesis en individuos inmunodeficientes (Metcalf y Moore, 1971).

Sin embargo, las UFC-B no son consideradas como las más primitivas, estudios semejantes han revelado que al adicionar 5-FU a los ratones recuperados, el 99.5% de UFC-B mueren, y sólo sobreviven células quiescentes con la habilidad de reconstituir la hematopoyesis a largo plazo. A estas células se les denominó pro-UFC-B o células tallo hematopoyéticas (CTH) (Orlic y Bodine, 1994).

Las células tallo hematopoyéticas dan origen a células precursoras comprometidas de linaje multi o monopotente y se les denomina como unidad formadora de colonias (CFU), la proliferación y diferenciación de estas células constituyen el compartimento de

las células maduras hematopoyéticas localizadas en la circulación sanguínea y otros tejidos (figura 1).

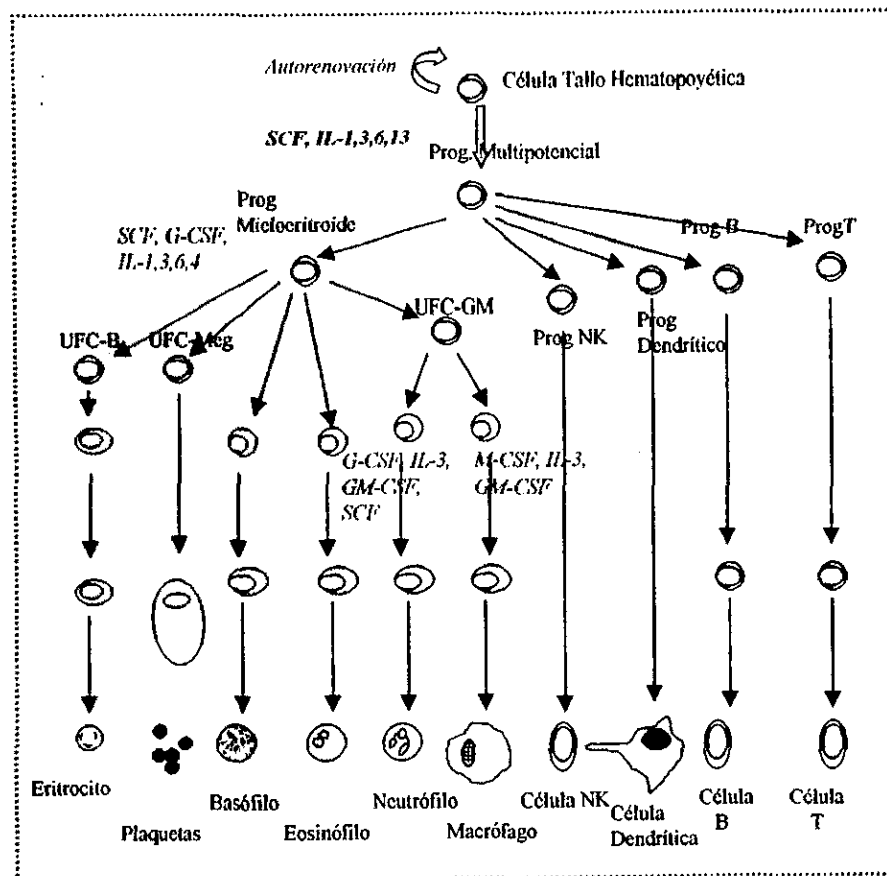


Figura 1. Modelo de la Hematopoyesis, mostrando las citocinas requeridas para la diferenciación de neutrófilos y macrófagos. (tomado y modificado de Morrison et al, 1994)

Prog, Progenitora

IL, Interleucina

UFC, Unidad Formadora de Colonias

CSF, Factor Estimulador de Colonias

SCF, Stem Cell Factor

G, Granulocitos

M, Macrófagos

GM, Granulocito-macrófago

Factores de crecimiento hematopoyético

Con los primeros ensayos de cultivo *in vitro* se estableció que las células precursoras hematopoyéticas provenientes de la médula ósea de ratón, sólo proliferan en presencia de células estromales, o de medios condicionado (MC) de cultivo de células integrantes del estroma de médula ósea (Plunik y Sachs, 1965). Más tarde se demostró que la proliferación de las células precursoras hematopoyéticas era responsabilidad de factores glicoproteicos presentes en el exudado. Estos factores, mostraban mayor actividad sobre un linaje celular específico; por ejemplo, el factor proveniente del MC de fibroblastos induce la formación de colonias del linaje monocito-macrófago (Metcalf y Burges, 1982). Por sus propiedades, este grupo de moléculas recibió el nombre de factores estimuladores de colonias (CSF's). Para la denominación de cada factor, se antepuso la letra inicial del grupo de células precursora que tiene como blanco principal; así el factor que da origen a los macrófagos se le conoce como M-CSF, al de granulocitos G-CSF y al de ambos GM-CSF (Metcalf y Burges, 1982), mientras que al factor que induce la proliferación de varios linajes incluyendo eosinófilos, eritrocitos, basófilos, megacariocitos, granulocitos-neutrófilos, y monocito-macrófago, se le denominó Multi-CSF, también conocido como interleucina-3 (IL-3) (Metcalf, 1993). La eritropoyetina (Epo), el M-CSF y el G-CSF son factores de linaje específico para la generación de eritrocitos, macrófagos y granulocitos, respectivamente (Dexter, 1989). Otros tienen actividad más amplia como el GM-CSF, IL-3 o el factor de células tallo (SCF) citocina que favorece la proliferación y sobrevivencia de células tallo primitivas o seminales.

La identificación y clonación de genes de los CSF's así como de sus receptores y la producción de citocinas recombinantes, aunado a la clonación de células hematopoyéticas sustentada por los CSF's, ha facilitado la caracterización de estos y otros factores que inducen la proliferación y diferenciación de células precursoras comprometidas e incluso de células tallo hematopoyéticas. Al conjunto de estos factores, incluyendo a los CSF's se les conoce como factores de crecimiento hematopoyético (FCH), o citocinas hematopoyéticas

(Sieff, 1990), actualmente se conocen más de 30 y la lista puede ir creciendo. Las citocinas que modulan la actividad de las células hematopoyéticas se han dividido por su efecto biológico y sus características moleculares en varias familias; factores de crecimiento, interleucinas, interferones, factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento transformante (Tabla I).

Para que los factores de crecimiento hematopoyético ejerzan su actividad deben unirse a receptores específicos sobre las células blanco. La formación del complejo ligando-receptor trae como consecuencia el desencadenamiento de señales intracelulares a través de la activación de tirosina cinasas, dando como resultado final la activación celular (Linnekin, *et al* 1992). En base a la homología en los dominios relevantes en la transducción de señales de los receptores, estos se han dividido en dos grupos principales: la familia de receptores de tirosina cinasa (RTC) y los receptores de las citocinas (RC). Los primeros tienen un dominio citoplasmático con actividad de tirosina cinasa responsable directo de iniciar las señales intracelulares. Los RC a pesar de que no se les conoce un sitio evidente de actividad tirosina cinasa, la unión de su ligando induce la fosforilación de tirosina de varias fosfoproteínas celulares, muchas de ellas detectadas segundos después de activado el receptor (Hallek, 1995).

Dos modelos generales se han propuesto para el papel de los FCH's en el control de la diferenciación de células hematopoyéticas. El modelo instructivo o determinístico establece que la citocina compromete a la célula multipotencial a un determinado linaje, mientras que en el estocástico sólo soporta la proliferación y sobrevivencia de células. Por lo tanto la diferencia entre los dos modelos radica en que en el instructivo, los receptores de la citocina transmiten señales para el comprometimiento a un linaje específico (Morrinson *et al*, 1995; Rodel y Link, 1996).

Familias	Moléculas	Sinónimos	Células blanco principales
Factores de Crecimiento	Multi-CSF	IL-3	Céls progenitoras multipotenciales
	GM-CSF	CSF- α	Macrófagos, neutrófilos y eosinófilos
	G-CSF	CSF- β	Neutrófilos
	M-CSF	CSF-1	Macrófagos
	EPO		Eritrocitos
	SCF	Ligando c-kit	Progenitores mieloides y linfoides
Interleucinas	IL-1	Hematopoyetina 1	Linfocitos T y B
	IL-2	TCGF	Linfocitos T y actividad de NK
	IL-3	Multi-CSF	Céls progenitoras multipotenciales
	IL-4	BSF-1	Linfocitos T y B
	IL-5	BCGF-CSF	Eosinófilos
	IL-6	BSF-2	Megacariocitos, linfocitos T y B
	IL-7		Precursores B y T, céls NK
	IL-8	NCF/NAP	Activa neutrófilos y monocitos
	IL-9	P40	Linfocitos y eritrocitos
	IL-10		Suprime act. de macrófagos
	IL-11		Céls progenitoras hematopoyéticas
	IL-12		Aumenta prolif. de céls hematopoyéticas
	IL-13		Linfocitos B
	IL-14		Linfocitos B
	IL-15		Linfocitos T
	IL-16		Quimiotactico y act de linfocitos
	IL-17		Est céls estromales a producir citocinas
IL-18		Ind prod de IFN- γ en céls T y NK	
Interferónes	IFN- α	IFN de leucocitos	Act antitumoral y antiviral
	IFN- β	IFN de fibroblastos	
	IFN- γ	IFN inmune	Act de macrófagos
Factores de Necrosis Tumoral	TNF- α	Cachectina	Efectos diversos en céls. epiteliales
	TNF- β	Linfotixina	
Factores de crecimiento Transformante	TGF- α		Fibroblastos y prom angiogenesis
	TGF- β		Inhibidor de prol de varios tipos céls.
Factor inh. de leucemia	LIF		Céls. prog. dependientes de IL-3

Tabla 1. Citocinas que modulan la actividad biológica de células hematopoyéticas. (Tomado de Bentzen, 1994).

CSF, factor estimulador de colonias; M, macrófagos; G, granulocitos; SCF, factor de células tallo; BSGF, factor de crecimiento de células B; BSF, factor estimulador de células B; NCF, proteína activadora de macrófagos; EPO, eritropoyetina; IL, interleucina; Ind, induce; Act, Activa; Céls, Células; Prog, Progenitoras; Prom, Promueve;

Líneas mieloides multipotenciales

El estudio de la hematopoyesis normal se ha facilitado gracias a la obtención de clones de líneas hematopoyéticas multipotentes "normales", cuyas células pueden cultivarse por tiempo indefinido pero retienen la capacidad de diferenciarse a múltiples linajes celulares mieloides y linfoides. Estas células son incapaces de reconstituir ratones letalmente irradiados o generar cualquier forma visible de colonias de bazo *in vivo*, evidenciando la pérdida de las propiedades normales características de las células tallo. La incapacidad de proliferar *in vitro* en ausencia de algún factor de proliferación específico, y la pérdida de tumorigenicidad *in vivo* apoyan fuertemente el argumento de que estas líneas no son malignas en el sentido clásico, y constituyen una valiosa herramienta para el estudio de la diferenciación hematopoyética. Las líneas de ratón FDCP-2, B6SutA, B6JutA y 32D son algunos ejemplos de este tipo de células (Humphires et al, 1981; Greenberger et al, 1983; Yoshikawa et al, 1996).

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

En la década de los 80's cuando se originó la línea 32D, se observó que sólo generaba colonias de células mast (Greenberger et al, 1983), posteriormente se derivaron clones independientes de IL-3, que proliferaban en presencia de GM-CSF, G-CSF y Epo (Migliaccio et al, 1989). Más recientemente se ha demostrado la diferenciación hacia granulocitos-neutrófilos en presencia de G-CSF, con lo cual se ha estudiado; la expresión de genes involucrados en la diferenciación (*Fvi-1*) (Morishita et al, 1992), la apoptosis al

ser transfectada con el gen bcl-2 (32bcl-2) (Ridel y Link, 1996), y la evaluación de la expresión de receptores para citocinas (Harris *et al*, 1998). También ha sido inducida hacia el linaje monocito-macrófago en respuesta al GM-CSF, pero fue necesario estimular primero la expresión del receptor para esta citocina. (Kreider *et al*, 1990).

Diferenciación monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo

Los monocito-macrófagos y los granulocito-neutrófilos, son fácilmente identificables en un frotis de médula ósea o de sangre periférica, sin embargo, en estadios mas tempranos de diferenciación, la identificación del linaje celular puede dificultarse. El desarrollo de técnicas inmunológicas y anticuerpos monoclonales (AcMo) como marcadores de superficie, han otorgado criterios adicionales para la identificación precisa de células mieloides de sangre periférica y sus precursores en la médula ósea. Algunos AcMo como 82H5, R1B19 y S4-7 son característicos de todo el linaje mielóide, mientras existen otros propios de los precursores para neutrófilos y monocitos (PM81) (*figura 2*). Sumado a esto la expresión de varios antígenos que corresponden a trayectorias de diferenciación en los linajes granulocítico y monocítico, ha sido una valiosa herramienta en la identificación de estas células hematopoyéticas en varias etapas de su maduración (Stites D, 1991).

Granulocito-neutrófilo

Los neutrófilos polimorfonucleares son los leucocitos predominantes en la circulación, tienen una breve existencia entre su formación en la médula ósea y la subsecuente actividad fagocítica y microbicida en los sitios de inflamación.

El desarrollo de los neutrófilos se ha dividido en seis sub-tipos morfológicamente reconocibles: mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, neutrófilo en banda y neutrófilo maduro. Su diferenciación está asociada con la reducción del volumen nuclear y celular, condensación progresiva de la cromatina en heterocromatina inactiva y la aparición secuencial de gránulos primarios (azurófilos) y específicos (Jandl, 1991).

El primer precursor identificable en la médula ósea es el *mieloblasto*, presenta un diámetro de 15 a 28 μm con un gran núcleo redondo, cromatina finamente dispersa y varios nucleolos, el citoplasma es escaso, moderadamente basófilo y totalmente agranular, en este estadio es ligeramente positiva la tinción citoquímica cloroacetato esterasa, específica para este linaje por lo que aumenta con la diferenciación. La etapa *promielocito* presenta características semejantes a los mieloblastos distinguiéndose por la aparición de gránulos primarios positivos para mieloperoxidasa pero negativos para fosfatasa alcalina además de perderse los antígenos Ia y MY-10. En el estadio *mielocítico* se adquieren los antígenos Mo1, MY8, CD10, CD11b y el B34.3, y corresponde al periodo de cambios morfológicos más notables, el borde de la cromatina nuclear es más evidente y el núcleo es excéntrico, aparecen gránulos específicos o secundarios donde se detecta por primera vez la fosfatasa alcalina, las mitocondrias disminuyen en número y los sacos del retículo endoplásmico se dilatan. El resultado de la división del mielocito es el *metamielocito*, corresponde a una célula pequeña con características del neutrófilo maduro, el fondo del citoplasma es uniformemente rosa, el núcleo se vuelve indentado y pierde la capacidad para proliferar, por lo tanto la maduración posterior consiste en la elongación y segmentación nuclear. El estadio en *banda* corresponde a neutrófilos jóvenes y se encuentran en la sangre de personas normales. Finalmente el *neutrófilo polimorfonuclear* es de tamaño pequeño, el núcleo está segmentado en dos a cinco lóbulos conectados con una hebra de cromatina, en ésta etapa del 80 al 90% son gránulos específicos (Toba *et al*, 1997; Dawson *et al* 1994; William, 1991; Zucker, 1988).

Diferenciación funcional

Los neutrófilos polimorfonucleares se presentan de manera temprana en la respuesta inflamatoria. Para realizar su función en los tejidos son capaces de adherirse al endotelio vascular, traspasar las paredes de los vasos capilares, migrar al sitio dañado (quimiotaxis), reconocer las particular extrañas o microorganismos, fagocitarlos y tener actividad microbicida (Stites D, 1991).

	Mieloblasto	Promielocito	Mielocito	Metamielocito	Célula en banda	Neutrófilo polimorfonuclear
Anticuerpos Monoclonales	PM81,L4 F3, Ia, MY9, IG10	PM81,L4 F3, MY8,MY 9, IG10	PM81,L4F3, Mo1, MY8,MY9, B4.3,G10	PM81,L4 F3, Mo1, MY8, IG10	PM81,L4 F3, Mo1, MY8, IG10	PM81,L4 F3, Mo1, MY8, IG10
Receptores Fc						
Tinción cloroacetato esterasa						
Fagocitosis						
Receptores para complemento						
Cap microbicida independiente de oxígeno						
Cap. microbicida dependiente de oxígeno						
Quimiotaxis						

Figura 2. Esquema de los diferentes estadios de diferenciación del granulocito-neutrófilo, representando la diferenciación morfológica, funcional y marcadores de superficie (Anticuerpos monoclonales, AcMo).

En el transcurso de su diferenciación el neutrófilo adquiere las características necesarias para cumplir sus funciones. En la etapa de promielocito aparecen los receptores Fc, pero a pesar de que su función es promover la fagocitosis, ésta se da hasta la etapa de metamielocito, cuando son adquiridos los receptores para complemento (CR₁ y CR₃) que reaccionan sinérgicamente con los Fc.

La capacidad microbicida se genera primeramente por mecanismos independientes de oxígeno, a través de enzimas lisosomales presentes en los gránulos y posteriormente por mecanismos dependientes de oxígeno, presentando la clásica explosión respiratoria. Esta función junto con la quimiotaxis son las últimas manifestaciones de capacidades funcionales y se observan plenamente hasta el estadio en banda y se sostiene en el polimorfonuclear (Tsoda *et al*, 1997; Inai *et al*, 1997; Glasser y Fiederlein, 1987) (figura 2).

Monocito-macrófago

Casi todos los tejidos, órganos y cavidades serosas alojan una población de fagocitos residentes, que permanecen de manera poco notable bajo condiciones normales, y son de aspecto y función muy similares entre sí. Sin embargo en algunos tejidos los fagocitos son particularmente abundantes, o tienen características morfológicas distintivas y se conocen por nombres específicos: los ejemplos incluyen las células de Kupffer que recubren los sinusoides de el hígado, los osteoclastos en el hueso, y la microglia en el encéfalo. Independientemente de su ubicación y aspecto, todos estos fagocitos asociados con los tejidos pertenecen a una línea celular simple conocida como el sistema fagocítico mononuclear (Stites *et al*, 1996). Este "sistema" incluye a los promonocitos y sus precursores en la médula ósea, monocitos en la circulación y macrófagos en los tejidos.

El linaje monocito-macrófago proviene de la multiplicación y diferenciación de la UFC-GM, originando el estadio *monoblasto* que corresponde a células de tamaño mediano, núcleo grande, con uno o dos nucleolos, indistinguibles de los blastos o mieloblastos. La generación de *promonocitos* a partir del monoblasto va acompañado de cambios evidentes,

siendo fácilmente reconocibles por su gran tamaño y cantidad de citoplasma, núcleo indentado y de forma irregular, el promonocito es liberado a la circulación como *monocito*, estas son células relativamente grandes, con núcleo en forma de riñón, cromatina nuclear laxa y su citoplasma abundante que contiene finos gránulos azurófilos. Los monocitos no son muy abundantes en la circulación periférica, donde representan únicamente de 1 a 6 % de todas las células sanguíneas nucleadas, en el ratón tiene una vida media en la circulación de 18 horas, migrando a los tejidos transformándose en *macrófago*, adoptando propiedades morfológicas y funcionales características del tejido en el cual residen (*figura 3*) (Zucker, 1988).

Muchos de los anticuerpos para el linaje monocito-macrófago son compartidos con los granulocitos-neutrófilos y su precursor (UFC-GM), ejemplo de ellos son el PM81, L4F3, IG10, Ia, MY9, etc., de igual manera algunos se generan en el estadio monoblasto (Mo1, 5F1, MY8), o hasta la etapa monocítica (CD11b, MY3), y otros son perdidos (IG10, RIB19,) en el transcurso de la diferenciación (*figura 3*) (Glasser y Fiederlein, 1987).

Diferenciación funcional

En general, el sistema del fagocito mononuclear está compuesto de células que poseen organelos desarrollados para la fagocitosis, endocitosis y actividad microbicida.

En la etapa de promonocito aparece la capacidad de endocitosis, movilidad y adherencia a superficies de vidrio, inicia la expresión de receptores Fc y C3b y presenta tinción peroxidasa positiva y aumenta la tinción para acetato esterasa, tinción específica del linaje monocítico que se observa desde el estadio de monoblasto. En la etapa de monocito se origina la actividad fagocítica y microbicida, en los que también existe respuesta a la inflamación y estímulos quimiotácticos. Finalmente los macrófagos se diferencian de los *monocitos* por su alta actividad enzimática, fagocitosis y la existencia de más receptores para inmunoglobulina y complemento, los gránulos que contienen peroxidasa son perdidos y aparecen lisozimas con enzimas hidrolíticas (Stites D, 1996; Jandl, 1991; William, 1991) (*figura 3*).

	Monoblasto	Promonocito	Monocito	Macrófago
Anticuerpos Monoclonales	PM81, L4F3, Ia, MY8, MY9, Mo2, Mo1, 5F1.	PM81, L4F3, Ia, MY8, MY9, Mo2, Mo1, 5F1.	MY3, PM81, L4 F3, Ia, MY8, MY9, Mo2, Mo1, 5F1.	MY3, PM81, L4 F3, Ia, MY8, MY9, Mo2, Mo1, 5F1.
Tinción acetato esterasa				
Receptores Fc				
Receptores para complemento				
Fagocitosis				
Capacidad microbicida				
Quimiotaxis				

Figura 3. Esquema de los diferentes estadios de diferenciación del monocito-macrófago, representando la diferenciación morfológica, funcional y marcadores de superficie (Anticuerpos monoclonales, AcMo).

Moléculas diferenciadoras distintas a los FCH's

La generación de macrófagos y granulocitos a partir de la UFC-GM, es promovida por algunas citocinas como el M-CSF, G-CSF y GM-CSF. Sin embargo existe una variedad de agentes químicos en los que se ha demostrado su capacidad de inducir diferenciación en células de leucemia mieloide. Por lo tanto, el efecto diferenciador de moléculas como el dimetil sulfóxido (DMSO), miristato de forbol (TPA), mizoribina, tetraóxido de arsénico y ácido retinoico (ATRA) entre otros, han sido evaluado *in vitro* en líneas celulares de leucemia mieloide, quienes sufren diferenciación principalmente hacia el linaje granulocítico o monocítico (Takeda *et al*, 1982; Chen *et al*, 1996; Moore, 1994).

El compuesto diferenciador más potente y mejor estudiado es el ATRA, 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) (Chomienne *et al*, 1990). 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 a algunos de sus metabolitos. El complejo ligando-receptor activan directamente la transcripción de genes blanco por la unión a secuencias específicas de ADN (Breitman *et al*, 1994; Dawson *et al*, 1994). En varios procesos celulares, incluyendo la diferenciación, está implicada la fosforilación/desfosforilación de proteínas, incluso se ha observado que durante la inhibición de la proliferación y diferenciación celular por ATRA se regula la actividad catalítica de proteínas serina/teorina fosfatasas (Omay *et al*, 1995).

A pesar de que el ATRA induce una remisión completa en el 85% de los pacientes con LPA, existen dos limitaciones clínicas, comúnmente del 5 al 25% de los pacientes sufren el síndrome del ácido retinóico, que causa una progresiva hoxemia y fallas multiorgánicas, además, de la mayoría sufre una recaída con resistencia al tratamiento con ATRA. se propone que en la resistencia al ATRA de estos pacientes, están implicados dos

tipos de receptores para los retinoides; el RAR y el RXR (receptor para retinoides). En las células con respuesta positiva al ATRA, comúnmente forman el heterodímero RAR/RXR. Estudios in vitro con células HL-60 resistentes al ATRA sugieren que se forma el homodímero RXR/RXR. Estos datos permiten especular la posible existencia de células leucémicas en los pacientes con características similares de forma tal que provoque la resistencia al tratamiento (Dawson *et al*, 1994; Toba *et al* 1997). También se ha propuesto que la 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 (Breitman *et al*, 1994).

DERIVADOS DE LA CASEINA

La caseína es la principal proteína de la leche, se encuentra en forma de micelas compuestas por cuatro clases de cadenas polipeptídicas designadas α -s₁, α -s₂, β y κ -caseínas, que junto con algunos derivados formados por proteólisis de estas cadenas son incluidas en la categoría de caseínas. La caseína, insoluble en agua, puede ser diluída en un álcali a pH 6.6 produciendo derivados solubles conocidos como caseinatos (Hall, 1971).

El caseinato de sodio se obtiene disolviendo caseína en hidróxido de sodio y posteriormente sometido a evaporación, con lo cual se obtiene un polvo blanco sin sabor, ni olor, soluble en agua y contiene un 65 % de proteínas. Debido a su excelente valor nutricional es ampliamente utilizado en la industria alimenticia (generalmente usado del 2 al 4 % del total de sólido en el producto), como fuente de proteínas en cereales y otros productos secos, especialmente en alimentos para bebés, productos dietéticos y para diabéticos (Walstra, 1984).

En el campo de la investigación, el caseinato de sodio y la caseína, son compuestos que al ser inyectados intraperitonealmente en ratones inducen una respuesta inflamatoria, participando como agentes quimiotácticos para leucocitos, lo cual favorece la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal (Pasotti, *et al* 1993). Hasta hoy el CasNa es utilizado básicamente para obtener un gran número leucocitos para evaluaciones *in vitro* o analizar leucocitos activados. Sin embargo algunos estudios sugieren que pueden inducir la producción de citocinas, de hecho se ha demostrado que en el suero y en la cavidad peritoneal de los ratones inyectados con CasNa y LPS se presenta actividad formadora de colonias para granulocitos (G-CSF) y macrófagos (M-CSF) (Lotem y Sachs, 1985).

Péptidos provenientes de las proteínas de la leche

Desde hace algunos años, varios autores han descrito péptidos bioactivos provenientes de las proteínas de la leche. Estos péptidos, inactivos dentro de la secuencia de la proteína madre, pueden ser liberados por proteólisis enzimática, como por ejemplo durante la digestión gastrointestinal. Una vez liberados en el cuerpo pueden actuar como compuestos reguladores con actividades semejantes a hormonas (Meisel, 1997). Aunque existen otros animales y plantas que contienen secuencias potencialmente bioactivas, las proteínas de la leche son la fuente principal de un amplio rango de péptidos biológicamente activos (Kayser, 1996) (*tabla 2*).

Efectos biológicos de los péptidos derivados de las caseínas

Recientemente, se ha identificado un amplio rango de actividades biológicas mediada por los péptidos derivados de la leche. Estos pueden ser antagonistas o agonistas de opioides, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), acarreadores de diferentes minerales y poseer actividades antimicrobianas y antitrombóticas (*tabla 2*).

En relación a los péptidos provenientes de las α , β y κ -caseínas tienen variados efectos en el sistema inmune, así se ha reportado inmunoreactividad de linfocitos de sangre periférica (LSP) estimulada o suprimida por péptidos como la 7- β -casomorfina y 10- β -casokinina, incluso se ha observado que a bajas concentraciones suprimen la proliferación de LSP pero es estimulada en concentraciones altas (Elitsur *et al*, 1991; Kayser, 1996).

Los neutrófilos polimorfonucleares humanos (NPM) también se ven afectados por los péptidos derivados de las caseínas en algunas de sus funciones básicas, como la

producción de radicales libres de oxígeno, producción del anión superóxido y leucotrieno B⁴ (Rabgaoui *et al*, 1994). Los fragmentos 194-199 de la caseína- α_1 y 63-68 de la β -caseína han mostrado que estimulan la fagocitosis de eritrocitos de carnero por macrófagos de ratón y ejercen un efecto de protección contra la infección de *Klebsiella pneumoniae* (Kampa *et al*, 1996).

Recientemente, ha existido interés en evaluar el efecto de las casomorfina en la proliferación de células tumorales, y se ha demostrado que en líneas de cáncer de próstata (LNCaP, DU145 y PC3) en presencia de la α -caseína 90-95 y 90-96, β -casomorfina 7 y 1-5, y la α_{s1} -casomorfina, existe una disminución en la proliferación dosis-dependiente (Kampa *et al*, 1996), posteriormente se observó el mismo efecto en la línea de cáncer de próstata T47D (Kampa *et al* 1996;).

La inhibición de la proliferación de las líneas de cáncer de seno y próstata fue observada primeramente en presencia de agonistas opioides (etilketociclazicina, etorfina, encefalina y morfina), pero bloqueado con el antagonista general de opioides (diprenorfina), por lo que se propone la existencia de sitios de unión específicos (receptores opioides) en estas líneas celulares. El efecto antiproliferativo de las casomorfina también fue reversible, aunque de manera parcial con el antagonista diprenorfina. (Kampa *et al* 1996; Kampa *et al* 1996; Hatzoglou *et al*, 1997). Además en varios estudios donde se ven implicadas las casomorfina se ha observado que su actividad es reversible con naloxone, otro de los antagonistas universales para receptores opioides, por lo que es aceptado que estos péptidos actúan vía receptor opioide (Elitsur *et al*, 1991; Meisel *et al*, 1997).

Secuencia peptídica	Fragmento	Nombre	Función biológica
	α_1-caseína		
RYLGYLE	90-96	α -casein exorfina	Agonista opioide, sistema inmune (neutrófilos), inhibe prolif. Cél. tumorales
RYLGYL	90-95	α -casein exorfina	Agonista opioide, inhibe prolif. céls. tumorales
YLGYLE	91-96	α -casein exorfina	Agonista opioide
FFVAP	23-27	α 1-casokinina-5	Inhibidores de angiotensina
FPVEFGK	28-34	α 1-casokinina-7	Sistema inmune
TTMPLW	194-199	α 1-casokinina-6	Sistema inmune
DIGSESTEDQAMEDIM	43-58	Caseinofosopeptido	Acarreadores de minerales
QMEAESISSSEIIVPNS VEQK	59-79	Caseinofosopeptido	Acarreadores de minerales
YVPXP	158-162	α 1-casomorfina	Agonista opioide, inhibe prolif. céls. tumorales
	β-caseína		
YFPFGPIPNLSL	60-70	β -casomorfina-11	Agonista opioide
YFPFGPI	60-66	β -casomorfina-7	Agonista opioide, Inhibidores de angiotensina
YFPFG	60-64	β -casomorfina-5	Agonista opioide
AVPYPQR	177-183	β -casokinina-7	Inhibidores de angiotensina
RELEELNVPGEIVESLS SSEESITR	1-25	Caseinofosopeptido	Acarreadores de minerales
YFPFG	1-5	β -casomorfina-5	Inhibe prolif. Cél. tumorales
YFPFGPI	1-7	β -casomorfina	Inhibe prolif. Cél. tumorales
	κ-caseína		
SRYPY.OCH3	33-38	Casoxina-6	Antagonista opioide
YIPIQYVLSR	25-34	Casoxina-C	Antagonista opioide
MAIPPKKNQDK	106-116	Casoplatelina	Actividad antitrombótica

Tabla 2. Funciones biológicas de los fragmentos bioactivos derivados de las α , β y κ caseínas. (tomado y modificado de Meisel et al. 1997)

Receptores opioides en el sistema inmune

Los péptidos opioides están involucrados en numerosos procesos fisiológicos que incluyen el control del dolor, respuesta al estrés, locomoción y conocimiento. El sistema opioide consiste en una familia de péptidos endógenos (endorfina) producidos por la hipófisis bajo el control del hipotálamo, que pueden actuar a través de tres clases de receptores de membrana designados μ , δ y κ . Estos receptores son también blanco de drogas opioides exógenas con fuertes acciones psicotrópicas y analgésicas (Gavériaux *et al.*, 1995).

Las evidencias del papel de receptores opioides en la modulación del sistema inmune se han incrementado en los últimos años y múltiples reportes describen efectos supresivo o estimuladores en modelos tanto *in vivo* como *in vitro*. Paralelo a esto se ha demostrado la existencia de receptores tipo opioide en células del sistema inmune. Inicialmente se observaron por la unión de ligandos sintéticos específicos, detectándose el receptor δ en linfocitos y leucocitos de sangre periférica (Carr *et al.*, 1988) y el receptor κ en la línea monocítica P-388 (Carr *et al.*, 1991).

La reciente clonación del receptor opioide δ en una línea celular de neuroblastoma de ratón y la identificación de los homólogos δ y κ del cerebro de roedores, han otorgado herramientas moleculares (RT-PCR) para probar la existencia de los receptores opioides en el sistema inmune. Así se ha concluido que a pesar de que no están distribuidas ampliamente en el sistema inmune, el receptor μ se encuentra en monocitos y linfocitos de sangre periférica, mientras que el receptor δ se expresa en algunas líneas de células T (MOLT-4, CEM, HSB2) y de monocitos (U937) (Gavériaux *et al.*, 1995).

Los receptores opioides presentes en las células del sistema inmune son funcionales, puesto que la morfina afecta la proliferación de la línea monocito-macrófago Bac 1.2 F5,

vía receptor opioide δ (Roy *et al*, 1996). Además se ha observado un aumento en el número y tamaño de colonias en cultivos de médula ósea en presencia de M-CSF y LPS al adicionar β -endorfina, efecto bloqueado por el antagonista opioide naloxone, proponiéndose que la β -endorfina actúa vía receptores opioides en estas células precursoras (Hagi *et al*, 1995).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la alta agresividad de la radio y quimioterapia usada en pacientes leucémicos, ha surgido la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas. El ácido retinoico ha demostrado favorecer la diferenciación de células leucémicas promielocítica aguda, tanto *in vitro* como *in vivo*, incluso se usa como primera opción en el tratamiento de este tipo de leucemias, sin embargo ha mostrado limitaciones clínicas, concretamente, los pacientes llegan a sufrir recaídas y presentan resistencia a posteriores tratamientos con ATRA, presumiblemente por su mecanismo de acción y metabolismo (Breitman *et al*, 1994; Toba *et al* 1997). Por lo anterior sigue vigente la necesidad de encontrar nuevas estrategias para inducir diferenciación tanto en células normales como leucémicas.

Recientemente, se demostró que el caseinato de sodio (CasNa), un agente inflamatorio usado para favorecer la migración de macrófagos y granulocitos a la cavidad peritoneal de ratón (Lotem y Sachs, 1985), induce la liberación del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) en los granulocitos-neutrófilos de la cavidad peritoneal de ratón (Santiago *et al*, 1994). Además, la exposición al CasNa de células en banda obtenidas de médula ósea, induce una alta tasa de diferenciación hacia neutrófilos segmentados y muerte por apoptosis en un tiempo menor comparado con el G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos), adicionalmente las células produjeron M-CSF con fuerte actividad biológica (Bautista, 1998 tesis).

A pesar de existir evidencias de que el CasNa es un diferenciador y activador de granulocitos, se desconoce si también modula la proliferación y diferenciación de células mieloides primitivas. Por lo que el presente trabajo, pretende contestar esta interrogativa usando como modelo a la línea mielóide primitiva 32 D, dependiente de IL-3.

HIPOTESIS

El CasNa a mostrado ser un agente quimiotáctico para *neutrófilos* y *macrófagos*, además acelera la diferenciación de células en banda a *neutrófilos* segmentados. Es posible que el o los mecanismos por los cuales el CasNa ejerce su efectos en las etapas terminales de los linajes *granulocito-neutrófilo* sea compartido con células *mieloides* más primitivas. La exposición del CasNa a la línea *mieloide* multipotencial 32D, una línea con capacidad de generar tanto *granulocitos* como *monocito-macrófagos*, permitirá evaluar si su efecto diferenciador abarca células *mieloides* más primitivas.

OBJETIVO

General

Determinar si el caseinato de sodio (CasNa) induce la diferenciación de la línea hematopoyética mieloide primitiva de ratón 32D.

Particulares

Determinar el tiempo y las concentraciones de CasNa necesarios para inhibir la proliferación de la línea 32D.

Evaluar si se afecta la viabilidad de las células 32D con las concentraciones de CasNa y el tiempo de cultivo necesarios para inhibir la proliferación.

Analizar si la reducción en la proliferación provocada por el CasNa, va acompañada de cambios morfológicos en los blastos de las células 32D hacia algún linaje hematopoyético.

Determinar a que linaje hematopoyético corresponde la diferenciación provocada por el CasNa en las células 32D.

Evaluar si además de la diferenciación morfológica inducida por el CasNa existe diferenciación funcional en las células 32D.

MATERIAL Y METODOS

Líneas celulares

La línea hematopoyética mieloide multipotencial 32D dependiente de IL-3 (Harris *et al* 1998; Morishita *et al*, 1992) fue gentilmente donada por la Dra. T. Hoang (Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, Montreal, Quebec Canadá), se cultivó en una atmósfera al 5% de CO₂ y 37° C, en medio Iscove's Modified Dulbecco's (Gibco BRL USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente desactivado (Gibco BRL USA) y 0.5 ng/ml de IL-3 o medio condicionado (MC) de WEHI 3BD+ al 10%. El cultivo fue mantenido con una densidad inicial de 1×10^5 células/ml y resembrando a las 48 hrs al llegar a 1×10^6 células/ml en cajas Petri (Fisher Brand, Denmark). Las concentraciones de IL-3 y MC de WEHI 3BD+ empleadas fueron obtenidas mediante ensayos dosis-repuesta.

La línea leucémica mielomonocítica de ratón WEHI 3BD+ (ATCC TIB-68) fue cultivada bajo las mismas condiciones que la línea 32D, y suplementada con 2-mercaptoetanol 0.05mM (Sigma Co. USA). La actividad de su medio condicionado se evaluó mediante la formación de colonias de células de médula ósea de ratón, en ensayos de bicapa en agar (Lotem y Sachs, 1985).

Ensayos para evaluar el efecto del CasNa

Las células 32D fueron cultivadas en placas de fondo plano de 96 pozos (Nunc, Denmark), con una densidad inicial de 25,000 células/ml en las condiciones ya descritas (IL-3, 0.5 ng/ml), y en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de CasNa o ATRA (ácido retinoico como testigo positivo) durante 48 o 96 horas.

Al emplear al ATRA como agente diferenciador de la línea 32D se obtuvieron resultados favorables a concentraciones cercanas a 1 μ M, por lo que fue utilizado como control positivo de diferenciación.

El ATRA se solubilizó en etanol absoluto (Taimi M y Breitman T, 1997) a una concentración Stock de 2 mM, manteniéndose a -20°C hasta su uso.

El Caseinato de Sodio (CasNa) (Difco Laboratories, USA) se disolvió en PBS al 10% w/v, y se almacenó a 4°C.

La β -caseína, caseína y el fragmento 1-5 β -casomorfina se solubilizaron en PBS a concentraciones de 10 mg/ml, 10 mg/ml y 1 mM respectivamente.

En los ensayos se anexaron controles con la concentración final de etanol y PBS en el cultivo (0.5% y 2% respectivamente), sin encontrarse diferencias con el negativo en los parámetros medidos (control).

PROLIFERACIÓN

Después de transcurrido el tiempo de cultivo indicado, se estimó el número celular por conteo directo después de resuspender la muestra y colocarse una alicuota en un hemocitómetro y realizar la conversión correspondiente para calcular la densidad celular (Isoda *et al*, 1997).

VIABILIDAD

Para evaluar la viabilidad celular se empleó el método de exclusión al Azul Tripano (Sigma Co. USA) mezclando a una proporción 1:1 del colorante y la muestra celular e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. La diferencia entre células muertas (teñidas con colorante) y vivas se realizó con la ayuda de un hemocitómetro (Rodel y Link, 1996; Chen *et al*, 1996).

DIFERENCIACIÓN

Morfológica

Se realizó un frotis y se tiñó con el colorante Giemsa, distinguiendo los blastos de los estadios diferenciados por su tamaño, forma del núcleo y la proporción núcleo/citoplasma (apéndice A) (Greenblatt y Elias, 1992; Zucker *et al*, 1988; Harris *et al*, 1998).

Citoquímica

Para identificar con mayor precisión los linajes celulares, se realizaron técnicas citoquímicas específicas para el linaje monocito-macrófago (Alfa-naftil acetato esterasa) y para el granulocito-neutrófilo (cloroacetato esterasa) (apéndices B y C) (Zucker *et al*, 1988; Migliaccio *et al*, 1989; Isoda *et al*, 1997).

Funcional

La diferenciación funcional fue evaluada mediante la reducción del NBT (Nitro azul de tretazolio) por los aniones superóxido, que indica la capacidad microbicida de monocitos y neutrófilos (Sonnenwirlt, 1986; Breitman, 1990; Nabeshima, 1997) (apéndice D), parámetro usado para evaluar la diferenciación funcional de las células 32D.

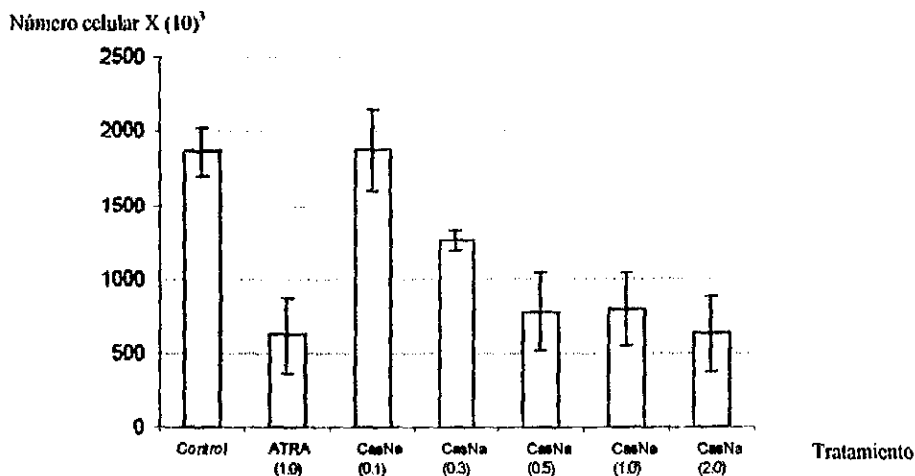
Varios

Cada experimento fue realizado por duplicado y repetido tres veces de manera independiente, los resultados son expresados con la media y su desviación estándar. En los ensayos de diferenciación (morfológicos, citoquímicos y funcionales) se contaron al menos 200 células por preparación y se tomaron fotografías a 100 x en un microscopio OLYMPUS B071.

RESULTADOS

El caseinato de sodio abate la proliferación de 32D

Al evaluar la proliferación de 32D a las 48 y 96 horas de cultivo en presencia o ausencia de 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 y 2 mg/ml de CasNa, sólo se observó una disminución de la proliferación y en forma dosis-dependiente a las 96 horas. De hecho la inhibición inició con 0.3 mg/ml y se redujo hasta un 60% con 2 mg/ml, valor semejante al control positivo (ATRA 1 μ M) (gráfica 1).

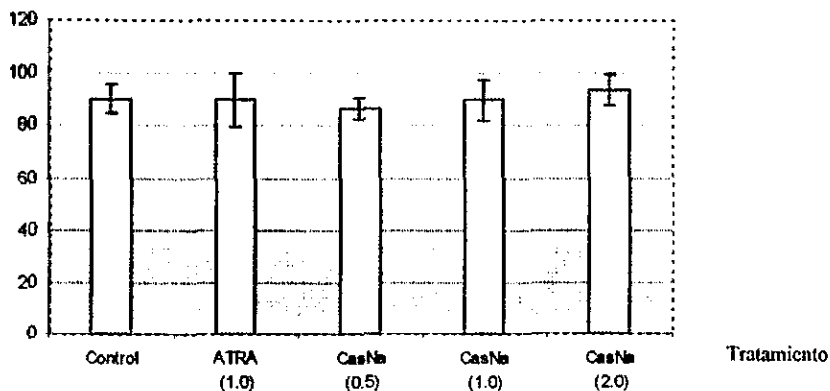


Gráfica 1. Proliferación de 32D después de 96 horas de cultivo en presencia o ausencia de Caseinato de Sodio (CasNa mg/ml) y Acido Retinoico (ATRA μ M).

La inhibición de la proliferación no es consecuencia de muerte celular

Para descartar que el efecto inhibitorio de la proliferación de 32D sea por toxicidad, se evaluó la viabilidad al tiempo y concentraciones en que el CasNa y ATRA abatieron la proliferación. El resultado es claro, tanto las células expuestas al CasNa como el ATRA tienen una viabilidad alrededor del 90 %, valor similar al control (*gráfica 2*).

% de viabilidad

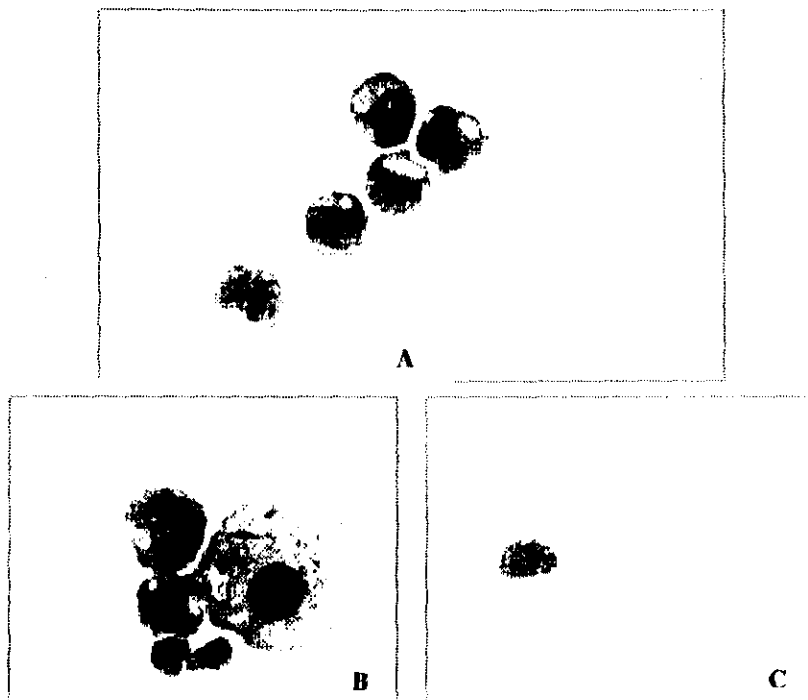


Gráfica 2. Viabilidad de 32D tratadas con CasNa (mg/ml) y ATRA (μ M) después de 96 horas de cultivo.

El CasNa promueve un cambio morfológico de las células blásticas 32D hacia el linaje monocito-macrófago

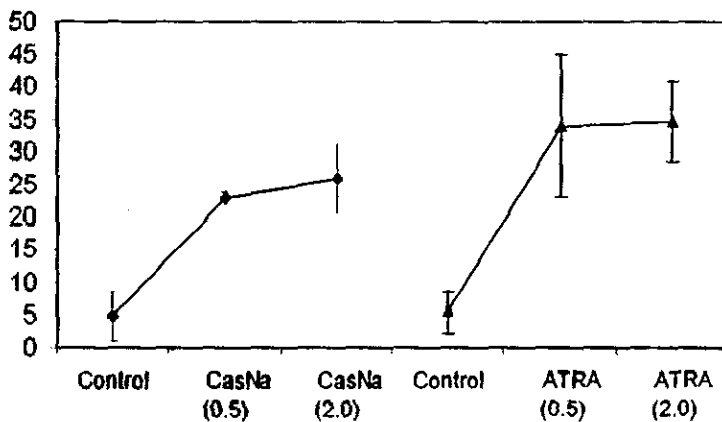
Una primera característica tangible de diferenciación que se estimó fue el cambio en la morfología que sufrieron las 32D con los distintos tratamientos. El control no sufrió cambios morfológicos, por tanto siguieron siendo blastos (*fotografía 1a*), mientras que en las tratadas con CasNa y ATRA existe un cambio evidente (*fotografía 1 b y c*) característico del linaje monocito-macrófago (aumento de tamaño y disminución en la relación núcleo/citoplasma). El porcentaje de células con esta morfología aumentó ligeramente a medida que se incrementa la concentración del CasNa y el ATRA (*gráfica 3*).

No se encontraron células con morfología de otros linajes a excepción del granulocito-neutrófilo por debajo del 5%, similar al control.



Fotografía 1. Morfología de células 32D teñidas con Giemsa después de 96 horas de tratamiento. A) Control negativo, B) CasNa, 1mg/mL, C) ATRA 1 μ M. 100X.

% de células
monocito-macrófago



Tratamiento

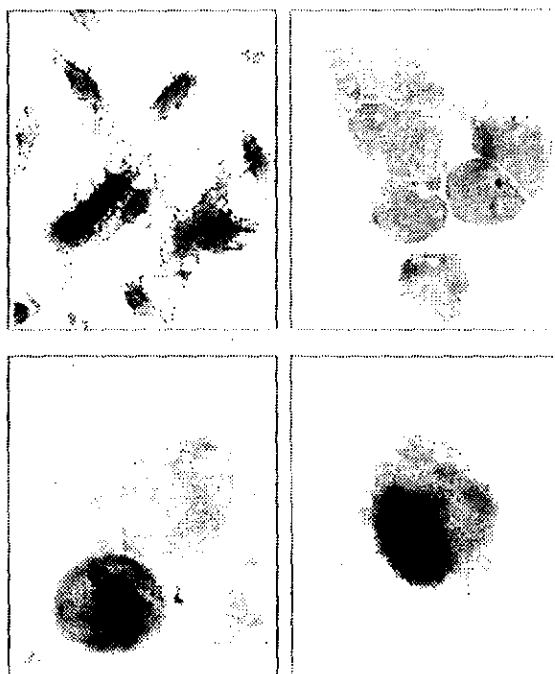
Gráfica 3. Porcentaje de células con morfología monocito-macrófago. Tratadas con CasNa (mg/ml) y ATRA (μ M)

Identificación citoquímica para el linaje monocito-macrófago.

Una vez que se reconoció un cambio en la morfología hacia el linaje monocito-macrófago, fue necesario confirmar el linaje celular mediante una caracterización citoquímica. Se utilizaron tinciones específicas tanto para monocitos (Alfa-naftil acetato esterasa) como granulocitos-neutrófilos (cloroacetato esterasa) (apéndice B y C).

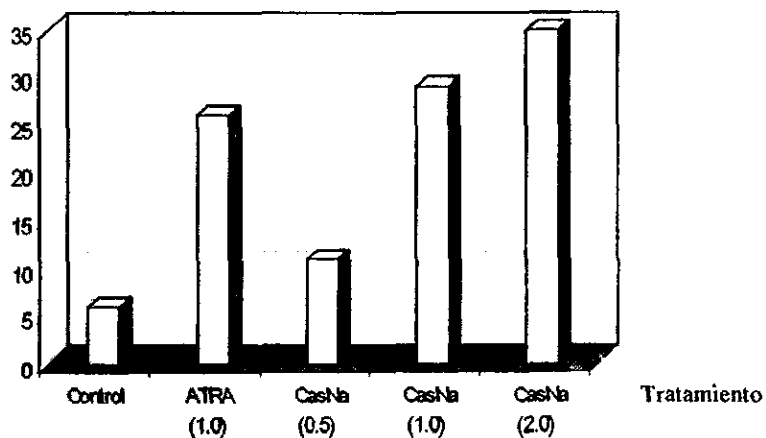
Las células tratadas con CasNa y ATRA se muestran positivas para la tinción del linaje monocítico (*Fotografía 2 c y d*), manifestando un precipitado color marrón en el citoplasma semejante al control positivo (la línea macrofágica P-388) (*Fotografía 2 a*), pero ausente en las 32D sin tratar (*fotografía 2b*). El porcentaje de células positivas alcanza hasta un 35 % (*gráfica 4*) con la mayor concentración de CasNa.

En la tinción para granulocitos-neutrófilos existió un porcentaje menor al 5% de células positivas tanto en el control negativo como en las células tratadas con CasNa y ATRA.



Fotografía 2. Células teñidas con alfa-naftil acetato esterasa. (a) P-388, (b,c y d) células 32D donde, (b) Control negativo (c) ATRA 1 μ M, (d) CasNa. 1 mg/ml. Cultivada por 96 horas. (100X)

% de células positivas

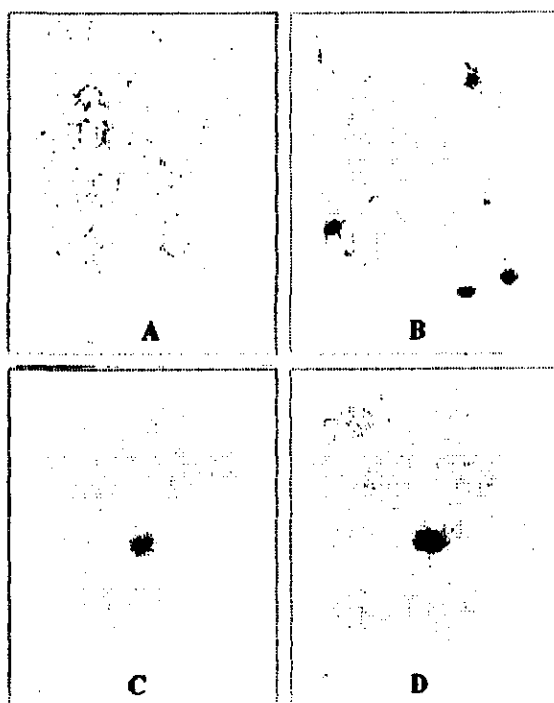


Gráfica 4. Porcentaje de células positivas para la tinción de esterasa específica. CasNa mg/ml, ATRA μ M.

Diferenciación funcional de las células 32D

Una característica de diferenciación funcional de macrófagos y neutrófilos es la actividad microbicida mediante la producción del anión superóxido, esta característica se evaluó por la reducción de NBT, utilizando granulocitos-neutrófilos obtenidos de médula ósea de ratón CD-1 como control positivo (apéndice D).

En ninguno de los ensayos se observó la presencia de células positivas en el control negativo (*fotografía 3 a*), mientras que las tratadas con CasNa y ATRA, independientemente de la dosis empleada, fueron NBT positivas pero en porcentaje bajos (aproximadamente 2% al 4%) (*fotografía 3 c y d*).



Fotografía 3. Reducción de NBT. A), 32D sin tratamiento B) Granulocitos de médula ósea como control positivo, C) 32D en presencia de ATRA y D) CasNa

Efecto de otros derivados de la caseína en las células 32D

Para tratar de entender el posible mecanismo de acción del CasNa se comparó su efecto con el de la caseína, la β -caseína y un péptido bioactivo de la β -caseína (péptido 1-5 β -casomorfina). Los resultados indican que todos tienen efectos similares al CasNa, tanto en proliferación como en el cambio morfológico hacia el linaje monocito-macrófago (tabla 3).

TRATAMIENTO	% DE INHIBICION DE LA PROLIFERACION	% DE CELULAS CON MORFOLOGIA MONOCITO-MACROFAGO
NEGATIVO	0	5
CasNa (1 mg/ml)	66.3 +/- 4.9	32
β -CASOMORFINA 1-5 (0.1 mM)	67 +/- 12.7	26
β -CASEINA (1 mg/ml)	49.7 +/- 12.7	33
CASEINA (1 mg/ml)	61 +/- 17	39

Tabla 3. Efecto de otros derivados de la caseína en las células 32D. Evaluados a las 96 horas de cultivo.

DISCUSION

La caseína y uno de sus derivados, el caseinato de sodio (CasNa) (Hall, 1971), han exhibido efectos similares como agentes quimiotácticos para granulocito-neutrófilos y monocito-macrófagos de cavidad peritoneal de ratón (Lotem & Sachs, 1985; Pasotti *et al*, 1993). Recientemente se encontró que el CasNa también activa y acelera la diferenciación de células en banda extraídas de médula ósea de ratón hacia granulocitos segmentados, (Bautista M, Tesis 1998). Ahora damos evidencias de que el CasNa actúa como un agente inductor de diferenciación en la línea celular hematopoyética primitiva (32D).

Las células 32D expuestas al CasNa en concentraciones próximas a 1mg/ml disminuyen su proliferación hasta en un 60%, actividad que no se debe a una toxicidad del CasNa o efecto del vehículo. Estudios previos establecen que la reducción de la división celular es una característica de células en cierta etapa de diferenciación (metamielocitos, promonocitos), o de células completamente maduras (Zucker D *et al*, 1988; Taimi M y Breitman T, 1997), por lo tanto consideramos que las células 32D están en un proceso de diferenciación. Nuestra hipótesis fue confirmada al observar que las células tratadas con CasNa sufren cambios morfológicos típicos hacia el linaje monocito-macrófago. Considerando que la línea 32D es reconocida como multipotencial y ha sido diferenciada hacia neutrófilos y monocitos (Valteri M *et al* 1987; Kreider B *et al* 1990), fue necesario confirmar la morfología observada, mediante tinciones citoquímicas específicas para cada linaje ya sea granulocito-neutrófilo o monocito-macrófago, resultando células positivas para esterasa no específica en presencia de CasNa, lo que indica su diferenciación hacia monocito-macrófago.

Debido a que las células 32D control (ausencia de CasNa o ATRA) no muestran tinción específica para granulocitos o monocitos, permite confirmar que estas células por lo menos son CFU-GM, ya que el siguiente paso en el camino de diferenciación son mieloblastos (linaje granulocítico) o monoblastos (linaje macrofágico) y ambos grupos de

células ya experimentan tinción linaje específico (Sun T *et al*, 1985; Li C *et al*, 1973). Estos datos indican que CasNa tiene como blanco por lo menos a células bipotenciales, aunque la 32D se reporta como multipotencial (Migliaccio *et al*, 1989)).

Por otro lado la fagocitosis y la actividad microbicida son funciones del linaje macrofágico en estadios terminales de diferenciación. La actividad microbicida es consecuencia de la capacidad de la célula para convertir oxígeno en metabolitos tóxicos como el anión superóxido, y es considerada como una prueba de diferenciación funcional que puede ser evaluada por reducción de NBT (Breitman T, 1990). Como se esperaba en los controles (sin tratamiento y vehículo) no se encontró una sola célula NBT positiva, pero sí en aquellas tratadas con CasNa, aunque sólo en aproximadamente el 4% de la población. Considerando que la capacidad microbicida es una de las últimas en adquirirse en el linaje monocítico (Glasser y Fiederlein, 1987), nuestros datos indican que tanto el CasNa como el ATRA, bajo nuestras condiciones y tiempo de cultivo no inducen una diferenciación completa en este grupo de células.

La línea 32D, a pesar de ser considerada como normal, no responde a muchas citocinas (GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-4, IL-6), pero si son tratadas previamente con GM-CSF, se estimula la expresión de receptores para GM-CSF y sólo bajo estas condiciones el GM-CSF es capaz de diferenciarlas a monocitos después de 6 días de cultivo (Kreider B *et al* 1990), sin embargo, sorprende el efecto del CasNa en las células 32D, ya que induce el mismo efecto en tan sólo 4 días y sin tratamiento previo.

Recientes investigaciones consideran a las proteínas de la leche como fuente principal de una variedad de péptidos biológicamente activos, los cuales actúan de forma similar a las hormonas. Estas secuencias, inactivas cuando forman parte de la estructura primaria de la proteína madre, son liberadas por proteólisis enzimática *in vivo* o *in vitro*, incluso se ha observado que los leucocitos de sangre periférica son capaces de degradar a la β -caseína (Verdi R y Barbando D, 1991; Elitsur Y, 1991; Meisel H, 1997). Una posible explicación del efecto del CasNa, caseína y β -caseína en la 32D es que estas células

también tengan la capacidad de degradar a estas moléculas y los péptidos liberados sean los responsables de la inhibición en la proliferación y diferenciación observada. La participación de los fragmentos de la caseína en la proliferación y diferenciación de las 32D es innegable puesto que el fragmento 1-5 de la β -caseína (1-5 β -casomorfina), mostró el mismo efecto de los demás derivados de la caseína (tabla 3).

En los últimos años varios investigadores han demostrado que los péptidos bioactivos sintetizados o aislados de las α , β y κ caseínas, afectan a células del sistema inmune, entre ellos está la activación de neutrófilos (Rabgaoui N, 1994) y proliferación de linfocitos (Kayser H, 1996; Elitsur Y, 1991), también existen reportes de abatimiento de la proliferación en líneas celulares tumorales de seno y próstata (Kampa M. et al, 1996; Kampa M. et al, 1997). Ahora en este trabajo se demuestra que el fragmento 1-5 de la β -caseína abate la proliferación e inducen la diferenciación en las células 32D.

Los péptidos bioactivos derivados de la caseína (también conocidos como casomorfinas), modulan la actividad celular al unirse a receptores tipo opioide (Hatzoglou A. et al, 1996; Kampa M. et al, 1997). Los receptores opioides fueron identificados, mediante la unión con su ligando y por técnicas de biología molecular (RT-PCR), primeramente en el sistema nervioso y posteriormente en células del sistema inmune, concretamente en linfocitos y leucocitos de sangre periférica y en líneas de tipo monocito-macrófago (P388d, U937) (Carr J. et al, 1988; Carr J. et al, 1991; Gavériaux C. et al, 1995). La presencia de receptores opioides en las células del sistema inmune explican la modulación de la proliferación de linfocitos mediada por la β -casomorfina 7 (Elitsur Y, 1991) o la morfina (Roy et al, 1996).

Aunque no se ha reportado la presencia de receptores opioides en las células mieloides primitivas, el hecho de que el fragmento 1-5- β -casomorfina induzca la diferenciación de 32D lo sugieren, incluso ya existe un indicio indirecto de la existencia de este tipo de receptores en células precursoras mieloides, ya que cultivos de células de médula ósea en medio semisólido en presencia de M-CSF, LPS, IL-1 suplementado con β -

endorfina (ligando de receptores opioides), aumenta el número de colonias del linaje macrofágico (Hagi et al, 1995).

Los datos aquí presentados son las primeras evidencias de que un compuesto proveniente de la caseína actúe en células hematopoyéticas primitivas, lo cual abre un vasto campo de investigación, entre ellos el proponer nuevos componentes y mecanismos de diferenciación donde intervengan ligandos y receptores opioides, donde una de las primeras tareas es comprobar la existencia de receptores tipo opioide funcionales en células precursoras hamtopoyéticas, datos que reforzarán las recientes hipótesis de comunicación bidireccional entre los sistemas inmune y neuroendócrino no sólo mediado por citocinas sino que también por los receptores opioides y sus ligandos.

Finalmente, aunque la línea 32D es catalogada como normal (Valtieri *et al*, 1987) el simple hecho de multiplicarse indefinidamente indica cierto grado de transformación, por lo tanto será pertinente confirmar el papel de estos péptidos en la hematopoyesis normal y sumamente interesante ver su efecto en líneas celulares leucémicas, pensando en la posibilidad de que el mecanismo diferenciador sea compartido con la línea 32D y se evalúe la pertinencia del empleo de estos péptidos en la terapia de pacientes con este tipo de problema oncológico.

CONCLUSIONES

El caseinato de sodio inhibe la proliferación de las células 32D en concentraciones cercanas a 1 mg/ml, hasta en un 60% a las 96 horas de cultivo.

No existe alteración en la viabilidad de las células 32D con las concentraciones de CasNa que abaten la proliferación.

El CasNa induce la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago de las células 32D.

Solo un bajo porcentaje de las células 32D tratadas con CasNa presentan diferenciación funcional.

REFERENCIAS

- Bautista M. (1998). 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.
- Bentzen K. (1994). Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol Lett* 43:111.
- Breitman T. (1990). Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL-60. *Method Enzymol* 190:118-130
- Breitman T, Chen Z, and Takahashi N. (1994). Potential applications of cytodifferentiation therapy in hematologic malignancies. *Sem Hematol* 31:18-25.
- Tomura M, Maruo S, Mu J, Zhou X, Ahn H, Hamaoka T, Okamura H, Nakanishi K, Clark S, and Kurimoto M. (1998). Differential capacities of CD4+, CD8+, and CD4-CD8- T cell subsets to express IL-18 receptor and produce IFN-gamma in response to IL-18. *J Immunol* 160:3759-65
- Cai X, Gommoll C, Justice L, Narula S, and Fine J. (1998). Regulation of granulocyte colony-stimulating factor gene expression by interleukin-17. *Immunol Lett* 62:51-8
- Carr J, Kim H, DeCosta B, Jacobson A, Rice K, and Blalock E. (1988). Evidence for a δ -class opioid receptor on cells of the immune system. *Cell Immunol* 116:44-51.
- Carr J, DeCosta B, Jacobson A, Rice K, and Blalock E. (1991). Enantioselective kappa opioid binding sites on the macrophage cell line, P388d. *Life Sci.* 49:45-51.
- D'Andrea A. (1994). Hematopoietic growth factors and the regulation of differentiative decisions. *Cur Opin Cell Biol* 6:804-808.
- Dawson M, Elstner E, Kizaki M, Chen D, Pakkala S, Kerner B, and Koeffler P. (1994). Myeloid differentiation mediated through retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RXR) not RXR/RXR pathway. *Blood* 84:446-452.
- Dexter T. (1989). Haemopoietic growth factor. *Brit Med Bulletin* 45:337-49.
- Chen G; Zhu J; Geng X; Hua J; Zhang H; Jin X; Si G; Tong W; LiX; MingS; Shen Z; and Sun G. (1996). *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB₄ cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML α /PML proteins. *Blood.* 88:1052-61.

Elitsur Y, and Luk G. (1991). Beta-casomorphin (BCM) and colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol* 85:493-497.

Erbe D, Collins J, Graziano R, and Fanger M. (1990). The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Mol Immunol* 1:57-67.

Gavériaux C, Peluso J, Simonin F, Laforet J, and Kieffer B. (1995). Identification of κ - and δ -opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett* 369:272-76.

Glasser L, and Flederlein R. (1987). Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 69:937-944.

Godin I, Gracia J, Coutinho A, Dieterien F, and Marcos M. (1993). Para-aortic aplanchnopleura from early mouse embryos contains B1 cell Progenitors. *Nature* 364: 67-70.

Gordon M, and Barret A. (1985). Bone marrow disorders; the biological basis of clinical problems: Chapter 2; Haematopoietic precursor cells. Blackwell Sci Publ. London. pp 20-59.

Grande A, Manfredini R, Tagliafico E, Balestri R, Pizzanelli M, Papa S, Zuchini P, Bonsi L, Bagnara G, Torelli U, and Ferrari S. (1995). All-trans-retinoic acid induces simultaneously granulocytic differentiation and expression of inflammatory cytokines in HL-60 cells. *Exp Hematol* 23:117-125.

Greenberger J, Sakakeeny M, Humphries R, Eaves C, and Eckner R. (1983). Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80:2931-5.

Greenblatt M, and Elias L. (1992). The type B receptor for tumor necrosis factor- α mediates DNA fragmentation in HL-60 and U-937 cells and differentiation in HL-60 cells. *Blood* 80:1339-46.

Hagi K, Inaba K, Sakuta H, and Muramatsu S. (1995). Enhancement of murine bone marrow macrophage differentiation by β -Endorphin. *Blood* 86:1316-21.

Hall C. (1971). *Drying of milk and products*. 2da edition. The Avi Publishing Company Inc. USA. pp 185-6.

Hallek M. (1995). Tyrosine kinases and phosphatases in hematopoietic growth factor signaling. In Mertelsmann R and Herrman F. *Hematopoietic growth factors in clinical applications*. Second Edition. Marcel Deker New York pp 19

Harris W, Hu X, Schultz S, Arcasoy O, Forget G, and Clare N. (1998). The distal cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor induces granulocytic differentiation in 32D cells. *Blood* 92:1219-24.

Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Hatzoglou C, Martin P, and Castanas E. (1996). Antiproliferative and receptor binding properties of α - and β -casomorphins in the T47D human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol* 310:217-223.

Hayashi M, Okabe J, and Hozumi M. (1994). Flow-cytometric analysis of *in vivo* induction of differentiation of WEHI 3BD+ myelomonocytic leukemia cells by recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 22:393-398.

Humphires R, Eaves A, and Eaves C. (1981). Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3629-3633.

Inai K, Tsutani H, Yamauchi T, Huberman E, Nakamura T, and Ueda T. (1997). Differentiation induction in non-lymphocytic leukemia cells upon treatment mizoribine. *Int J Hematol* 66:335-44.

Isoda H, Shinmoto H, Kitamoto D, Matsumara M, and Nakahara. (1997). Differentiation of human promyelocytic cell line HL-60 by microbial extracellular glycolipids. *Lipids* 32:263-71.

Jandl J.(1991). *Blood: Pathophysiology*. Blackwell Scientific Publications, USA. pp. 524.

Kayser H, and Mensel H. (1996). Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett* 383:18-20.

Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Martin P, and Castanas E. (1996). Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α _{S1}-casein (α _{S1}-casomorphin, and α _{S1}-casomorphin amide). *Biochem J* 319:903-08.

Kampa M, Bakogeorgou E, Hatzoglou A, Damianaki A, Martin P, and Castanas E. (1997). Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation the prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 335:255-365.

Kreider B, Phillips P, Prystowsky M, Shirsat N, Pierce J, Tushinki R, and Rovera G. (1990). Induction of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) receptor by granulocyte CSF increases the differentiative options of a murine hematopoietic progenitor cell. *Mol Cell Biol* 10:4846-53.

- Laberge S, Cruikshank W, and Beer D. (1996). Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. *J Immunol* 156:310-5
- Li C, Lam K, and Yam L. (1973). Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 21:1-12
- Linnekin D, Park L, and Farrar W. (1992). Dissociation of human cytokine receptor expression and signal transduction. *Blood* 80:1896-904.
- Lotem J, and Sachs L. (1985). Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: *in vivo* regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer* 35:93-100.
- Metcalf D. (1993). Hematopoietic regulators: Redundancy or subtlety?. *Blood* 82:3515-3523.
- Metcalf M, and Burgess A. (1982). Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. *J Cell Physiol* 11:275.
- Metcalf D and Moore M. (1971) Hematopoietic cells. *Frontiers of biology*. Vol. 24. North Holland Publishing Company. Amsterdam.
- Medvinsky A, Samoylina N, Müller A, and Dzierzak E. (1993). An early pre-liver intra-embryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364:64-67.
- Meisel H. (1997). Biochemical Properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43:119-128.
- Migliaccio G, Miglaccio A, Kreider B, Rovera G, and Adamson J. (1989). Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at differentiation from the murine cell line 32D. *J Cell Biol* 109:833-41.
- Moore D, Kalvakolanu D, Lippman S, Kavanagh J, Hong W, Borden E, Paredes M, and Krakoff I. (1994). Retinoic acid and interferon in human cancer: Mechanistic and clinical studies. *Sem Hematol* 31:31-37.
- Morishita K, Parganas E, Matsugi T, and Ihle J. (1992). Expression of the *Evi-1* zinc finger gene in 32Dcl3 myeloid cells blocks granulocytic differentiation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Mol Cell Biol* 12:183-9.
- Morrison S, Uchida N, and Weissman I. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:35-71.

Nabeshima R, Aizawa S, Nakano M, Toyama K, Sugimoto K, Kaidow A, Imai T, and Handa H. (1997). Effects of vesnarinone on the bone marrow stromal cell-dependent proliferation and differentiation of HL60 cells *in vitro*. *Exp Hematol* 25:509-15.

Omay S, Nishikawa M, Morita K, Toyoda H, Nakai K, Nagao M, Saito M, and Shiku H. (1995). Decreased expression of protein phosphatase type 2^a in HL-60 variant (HL-60r) cells resistant to induction of cell differentiation by all-trans retinoic acid. *Exp Hematol* 23:244-251.

Orlic D, and Bodine D. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up!. *Blood* 84:2991-2994.

Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, and Frigo G. (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Med Farmacol* 2:71-81.

Pluznik D, and Sachs. (1965). The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66:319-24.

Rabgaoui N, Guérin M, and Torrelles J. (1994). Casein-derived peptides can modulate the production of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid in human neutrophils. *Biochem Cell Biol* 72:305-310.

Rodel J, and Link D. (1996). Suppression of apoptosis during cytokine deprivation of 32D cells is not sufficient to induce complete granulocytic differentiation. *Blood* 87:858-64.

Roitt M. (1992). *Essential immunology*. Seventh edition., Blackwell Scientific Publications. Oxford, CA. USA. 365 pp.

Roy S, Sedqi M, Ramakrishnan S, Barke R, and Loh H. (1996). Differential effects of opioids on the proliferation of a macrophage cell line, Bac 1.2F5. *Cell Immunol* 169:271-77.

Santiago E, Mora L, Montesinos J, Ventura J, Machuca C, Mendoza J, Flores F, Hernandez J, and Weiss B. (1994). Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblasts. *Rev Inv Clin Suplemento*, Abril 1994.

Sieff C. (1990). Biological and clinical aspects of the hematopoietic growth factors. *Annu Rev Med* 41:483-96.

Sonnenwirth C, y Jarett L. (1986). *Métodos y diagnósticos de laboratorio*. 8va. Edición. Panamericana, México. Tomo II. pp 1153-4

Stites D. (1996). *Basic and clinical immunology*. 8^a edition USA. pp 23-7

Taimi M, and Breitman T. (1997). Growth, differentiation, and death of retinoic acid-treated human acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Exp Cell Res* 230:69-75.

Sun T, Li C, and Yam L. (1985). Atlas of Cytochemistry and Immunocytochemistry of Hematologic Neoplasms. ASCO Press, Chicago, IL.

Takeda M, Minowada J, and Bloch A. (1982). Kinetics of appearance of differentiation-associated characteristics in ML-1. A line of human myeloblastic leukemia cells, after treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, Dimethyl sulfoxide, or 1- β -D-arabinofuranosytosine. *Cancer Res* 42:5152-5158.

Toba K, Koike T, Wang Y, Nagai K, Takahashi H, Hashimoto S, Uesugi Y, and Aizawa Y. (1997). Prediction of growth sensitivity of acute promyelocytic leukemia cells to granulocyte colony-stimulating factor using 7AAD/PY during administration of all-trans retinoic acid. *Int J Hematol* 66:203-212.

Toles J, Chui D, Belbeck L, Starr E, and Barker J. (1989). Hemopoietic stem cells in murine embryonic yolk sac and peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7456-7459.

Valtieri M, Tweardy D, Caracciolo D, Jhonson K, Mavilio F, Altman S, Santoli D, and Rovera G. (1987). Cytokine-dependent granulocytic differentiation. *J Immunol* 11:3829-35.

Verdi R, and Barbano M. (1991). Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. *J Dairy Sci* 74:2077-81.

Wallace P, Howell A, and Fanger M. (1994). Role of Fc γ receptors in cancer and infectious disease. *J Leukocyte Biol* 55:816-26.

Walstra P, and Jenneis R. (1984). Dairy Chemistry and Physics. John Wiley Sons, New York 106 pp.

Whetton A, and Dexter T. (1989). Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim Biophys Acta* 989:111-132.

William S. (1991). Hematology. Fifth edition. The MIT Press Cambridge. London England 474 pp.

Yoshida Y. (1994). Overview of the hematopoietic growth factors cytokines past, present and future. *Int J Hematol* 60:177-183.

Yoshikawa H, Sakihama T, Nakajima Y, and Tasaka K. (1996). Costimulation of fibronectin promotes Fc γ R-mediated rescue of IL-3-dependent bone marrow-derived cells from apoptosis. *J Immunol* 156:1832-1840.

Zucker D, Greaves M, Grossi C, and Marmont A. (1988). Atlas of bloods cells. Function and pathology. 2da. Edición. Arti Grafiche Salea, Italy. Vol. 1, 761 pp.

APENDICE A

Tinción con Giemsa

Reactivos

1.- Solución Stock

Disolver 50 mg de Giemsa
en 5 ml de metanol (cubrir de la luz)

2.- Solución de tinción. (Preparar al momento de la tinción)

Tomar 1 ml de la solución stock y diluir con 9 ml de H₂O destilada

Procedimiento

Preparación de la muestra

-Tomar una alícuota (30-40 μ l) y colocarla en la camisa para la centrifuga (Shandon Southern cytospin)

colocar el porta-objetos y centrifugar a 1000 RMP por 5 minutos. Dejar secar.

-Fijar la muestra por 3 min. con metanol. Dejar secar.

-Teñir con la solución de tinción de 10 a 15 minutos, lavar a chorro de agua. Dejar secar.

Determinación de la morfología

Observar la morfología bajo el microscopio (40 y 100X) y distinguir las células diferenciadas de los blastos; Los monocitos presentan un tamaño mayor al de los blastos, la intensidad de coloración del citoplasma es menor, el núcleo puede ser excéntrico e indentado y disminuye la proporción núcleo/citoplasma. Los granulocitos-neutrófilos comparten las características de los monocitos excepto que su tamaño es semejante a los blastos y en el estadio en banda el núcleo tiene forma de dona.

APENDICE B Análisis citoquímico

Tinción α -naftil acetato esterasa para monocito-macrófago

Reactivos.

1.- Alfa-Naftil Acetato

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

Disolver acetato de sodio (60 mg) en acetona (60 ml), adicionar agua destilada (40 ml) y ácido acético (70 μ l).

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

Disolver pararosanilina (1gr) en HCL 2N (25 ml) realizarlo en caliente (baño maría) filtrar cuando esté a temperatura ambiente).

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

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

a) 11.9 g de NaH_2PO_4 monohidratado(fosfato de sodio ácido) en (500 ml) de Agua destilada.

b) 14.196g de Na_2HPO_4 Fosfato de sodio dibásico en 500 ml de agua destilada
Mezclar 250 ml de la solución b con 130 ml de la solución a

6.- Hematoxilina de Meyer (Sigma USA)

7.- Suero fisiológico

NaCl al 0.9%

Procedimiento

***Se utilizó como control positivo la línea celular leucémica de tipo monocito-macrófago P388

1.-Fijar los extendidos con la solución fijadora durante un minuto

Lavar con suero fisiológico

2.- Incubar durante 60 min. en la siguiente solución

a) 50 μ l de la solución de nitrito de sodio + 50 μ l de la solución de pararosanilina

Mezclar las dos soluciones durante un minuto, adicionar 5ml de la solución de fosfatos 0.2 M

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APENDICE B Análisis citoquímico (continuación)

Tinción α -naftil acetato esterasa para monocito-macrófago

b) Diluir 10 mg de α -naftil acetato en 0.2-0.3 ml de acetona después agregar agitando 20 ml de la solución de fosfatos 0.2 M

c) Mezclar las dos soluciones y filtrar

Lavar con aguas destilada

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

Lavar abundantemente con agua destilada

(En las células positivas se observa como un precipitado difuso color marrón en el citoplasma)

APENDICE C Análisis citoquímico
Tinción cloro acetato esterasa para granulocito-neutrofilo

Reactivos.

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

Disolver 5mg en 2,5 ml. de N-N, dimetil formamida

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

Disolver en agua destilada(30 ml)

Na₂HPO₄(20 mg)

KH₂PO₄ (100 mg)

Acetona (45 ml)

Formaldheido(25 ml)

PH 6.6

3.-Solución de fuccina nueva (estable por dos meses, T. ambiente)

Disolver fuccina (1gr) en HCL 2N (25 ml) realizarlo en caliente (baño maria) filtrar cuando alcance la temperatura ambiente).

4.-Solución de nitrito de sodio. (7 días 4° C) (1gr) en (25 ml) de agua destilada

5.- Solución de fosfatos pH 7.73

(0.852 gr) Na₂HPO₄, (0.09gr) KH₂PO₄ en agua destilada 100 ml.

6.- Hematoxilina de Meyer (Sigma USA)

7.- Suero fisiológico

NaCl al 0.9%

Procedimiento

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

1.-Fijar los extendidos con la solución fijadora durante un 30 segundos

Lavar con suero fisiológico

2.- Incubar durante 30 min. en la siguiente solución

a) 50 µL de la solución de nitrito de sodio + 50 ml de la solución de fuccina nueva

Mezclar las dos soluciones durante un minuto, adicionar 9.5 ml de la solución de fosfatos pH 7.73

Agregar 0.5 ml de la solución de naftol AS-D Cloroacetato

Lavar con agua destilada

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

Lavar abundantemente con agua destilada

(En las células positivas se observa granulos rojos brillantes en el citoplasma)

APENDICE D

Prueba de diferenciación por Nitroazul de tetrazolio (NBT)

1.- NBT (Nitro azul de tetrazolio) 1.2 mM

1mg de NBT por ml de PBS. (guardar a 4 °C, es útil por una semana)

2.- TPA (Miristato ácido de forbol) 324 µM

200 µg de TPA/1ml de Dimetil sulfoxido. Almacenar a -20°C

3.- Solución TPA/NBT

Hacer una mezcla de las soluciones adicionando 1µl de TPA por 1000 µl de NBT con SFB al 10%

Procedimiento

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

-Determinar la viabilidad por exclusión al azul tripano

-Mezclar volúmenes iguales de la solución TPA/NBT y del cultivo celular, agitar suavemente

-Incubar 30 min. a 37°C y 5% de CO₂

-Realizar citospin tomando una muestra de 30-40 µl.

-Fijar con metanol

-Observar al microscopio las células positivas.

Las células maduras monocitos y granulocitos-neutrófilos, producen anión superóxido cuando son estimulados con TPA. Este anión reduce el NBT soluble en agua y produce un color azul oscuro (Azul de nitro diformazan, NBD) asociado con las células.