



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACIÓN CELULAR
Y CANCER
LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR
DEL CANCER

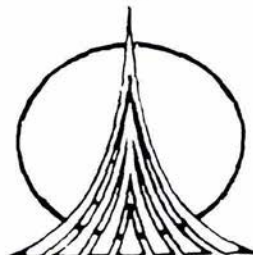
ESTIMULACION DE LA HEMATOPOYESIS MEDULAR Y
EXTRAMEDULAR INDUCIDA POR EL CASEINATO DE SODIO
(CasNa) EN RATONES BALB-c

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
HUGO ENRIQUE LAGUNES SERVIN

DIRECTOR: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

ASESOR: DR. BENNY WEISS STEIDER



MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

" primero piensa y después siente "

José Lagunes Utrera

A mi padre q.e.p.d.

A mi madre, por estar siempre conmigo apoyándome en todo, y mis hermanos **Mauricio**, **Arturo** e **Itzel**.

A mis tíos **Saidel** y **Hortencia**.

Al Dr. **Edelmiro Santiago Osorio** por su apoyo

A la Dra. **Elizabeth Morales Salinas**, al Dr. **Néstor Ledesma** por su apoyo en los cortes histológicos.

Al Maestro **Tapia** por su ayuda en la toma de las fotografías.

A los colegas **Adriana**, **Brenda**, **Edgar**, **Erick**, el maestro **Fernando**, **Gerardo**, **Javier**, **Laura**, **Lulu**, **Magali**, **Yolita**.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CÁNCER DE LA FACUTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO Y LA ASESORIA DEL DR. BENNY WEISS STEIDER.

INDICE

| | |
|----------------------------------------|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| Células tallo hematopoyéticas | 3 |
| Microambiente hematopoyético | 8 |
| Factores de crecimiento hematopoyético | 10 |
| Bazo y hematopoyesis | 14 |
| Caseínas y hematopoyesis | 18 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 20 |
| JUSTIFICACIÓN | 21 |
| HIPÓTESIS | 22 |
| OBJETIVOS | 23 |
| METODOLOGÍA | 24 |
| RESULTADOS | 28 |
| DISCUSIÓN | 36 |
| CONCLUSIONES | 41 |
| APÉNDICE | 42 |
| BIBLIOGRAFÍA | 44 |

RESUMEN

La generación de células de la sangre, evento conocido como hematopoyesis, tiene lugar en la médula ósea, sitio donde se localizan las células primitivas hematopoyéticas, las cuales dan origen por multiplicación y diferenciación celular a los diferentes linajes celulares sanguíneos.

La hematopoyesis es regulada por una serie de moléculas glicoprotéicas conocidas como factores de crecimiento hematopoyéticos, producidas por células estromales y las propias células sanguíneas. Recientemente se mostró que la hematopoyesis *in vitro* puede ser regulada por moléculas distintas a los factores de crecimiento hematopoyético, particularmente por el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína.

En este trabajo se muestra que la inyección de CasNa vía intraperitoneal en ratón, incrementa el número de células mononucleadas en médula ósea sin afectar la viabilidad celular, además, incrementa el tamaño del bazo y los cortes histológicos permiten visualizar el incremento del tamaño de los centros germinales, así como de la densidad celular, parámetros que indican activación hematopoyética medular y extramedular. En conclusión, en este trabajo se muestra que el CasNa activa la hematopoyesis *in vivo*.

HEMATOPOYESIS

Las células presentes en la circulación sanguínea se encargan fundamentalmente del transporte de oxígeno por parte de los eritrocitos y de la defensa del organismo contra agentes extraños ya sean exógenos (bacterias, hongos, virus etc.) o endógenos (células tumorales, etc.) tarea llevada a cabo por los linfocitos, monocitos, y granulocitos. Estas células tienen periodos de vida relativamente cortos desde unas horas como los granulocitos o hasta varias semanas como los eritrocitos.

De forma tal que diariamente mueren y se originan grandes cantidades de estas células, este proceso es conocido como hematopoyesis (*haima*, sangre y *poyesis*, producción) (Zambrano et al, 1999).

La actividad hematopoyética se inicia en el saco vitelino, se observa en ratón a los 7 días de gestación (McKenzie, 1991). Posteriormente las células del saco vitelino migran a otros órganos con actividad hematopoyética como el bazo, hígado y el timo (Toles et al, 1989). En bazo se activa la eritropoyésis, mielopoyésis y linfopoyésis (Lipschitz et al, 1984), la eritropoyésis en bazo continúa hasta el término de la gestación mientras que la linfopoyésis en este órgano sigue toda la vida (Miales, 1985), finalmente la actividad hematopoyética pasa a la médula ósea (Morrison et al, 1985).

Para favorecer el desarrollo de la hematopoyesis, en médula ósea existe un ambiente particular llamado microambiente hematopoyético, está constituido por distintos tipos de células estromales como fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipositos, estas células producen una serie de moléculas conocidas como citocinas o factores de crecimiento hematopoyético (HGF, por sus siglas en inglés; hematopoietic growth factors) y son las responsables de modular la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas hasta generar ocho diferentes tipos de células sanguíneas maduras: linaje mieloide (eritrocitos, megacariocitos, monocitos-macrófagos, granulocitos-neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y linaje linfoide (linfocito T y B) (Cronkit y Feinendegen, 1976).

CÉLULAS TALLO HEMATOPOYÉTICAS

La existencia de las células tallo hematopoyéticas fue evidenciada por Till y McCulloch, cuando descubrieron que se evitaba la muerte de ratones irradiados letalmente mediante la inyección de células de médula ósea normal (Till y McCulloch, 1961).

Tras la inyección de células normales, se presentaban focos de alta tasa de proliferación localizadas en el bazo de los ratones recuperados, cada foco de crecimiento contenía células en diferente grado de maduración, estos eran de tipo granulocítico, monocítico o eritrocítico, y lo más interesante es que se formaban focos de proliferación constituida por una mezcla de estos tipos celulares incluyendo a los linfocitos. Cada foco de células en crecimiento provino de la multiplicación de una sola célula precursora, la proliferación de varias de ellas fue lo que reconstituyó el tejido hematopoyético de los ratones transplantados (Becker et al, 1963).

A las células capaces de dar origen a un nódulo de proliferación, después de 7 a 14 días de transplante, se les llamó unidad formadora de colonias de bazo (CFU-S del inglés colony forming unit-spleen).

Los cultivos *in vitro* de células de médula ósea de ratón por siete días también desarrollaron colonias de células hematopoyéticas, lo que confirmó la existencia de las CFU-S (Williams et al, 1983). Fue así como se concluyó que en la médula ósea existen células progenitoras hematopoyéticas con la capacidad de reconstituir la hematopoyesis en individuos inmunodeficientes, a las cuales se les conoce como células tallo hematopoyéticas.

Los focos de proliferación compuestos de células de tipo granulocito, monocito etc. y la formación de focos de proliferación con composición celular mixta, indica la existencia de células precursoras monopotenciales y multi o pluripotenciales. Las CFU-S multipotenciales fueron consideradas como las células precursoras hematopoyéticas más

primitivas a las cuales se les llamó célula tallo hematopoyética (HSC), y se le definió como células con capacidad de autorrenovación, alto potencial proliferativo y capacidad para diferenciarse a todos los linajes hematopoyéticos (Kondo et al. 2003). Las HSC han sido divididas en dos subgrupos uno de largo plazo (LT-HSC), las cuales representan solo el 0.007 % en el ratón (Mehtus et al, 1998), y son capaces de autorrenovarse indefinidamente, y las de corto plazo (ST-HSC) que solo pueden autorrenovarse por un periodo de seis a ocho semanas (Passegué et al, 2003). Mientras que las LT-HSC se autorenevan durante toda la vida, las ST-HSC solo mantienen esta capacidad por ocho semanas (Morrison et al, 1994), y dan lugar a los progenitores multipotenciales (MPP), los cuales se diferencian hacia progenitores restringidos de oligolinaje y pueden autorrenovarse por un periodo menor a dos semanas (Morrison et al, 1997) (Weissman , 2002).

Se han identificado dos clases de progenitores de oligolinaje restringido en el ratón: los progenitores linfoides comunes (CLP) los cuales están restringidos a nivel clonal para dar origen a linfocitos T, linfocitos B y células naturales asesinas (NK) (Kondo et al, 1997) (Figura 1), y los progenitores mieloides comunes (CMP), estos dan origen al linaje mieloides, como los monocitos/macrófagos, granulocitos, y progenitores megacariocito/eritroides los cuales se diferencian hacia megacariocitos/plaquetas y eritrocitos, estos progenitores aún mantienen el potencial para la diferenciación hacia el linaje de células B, pero a una frecuencia extremadamente baja (Akashi et al, 1999). Algo interesante es que ambas clases de progenitores pueden generar células dendríticas, sugiriendo con esto la existencia de vías alternas para la generación del linaje linfoides y mieloides (Traver et al, 2000; Manz et al, 2001).

En ratones jóvenes, el número de células HSC en tejido hematopoyético es constante (Morrison et al, 1996) y solo unas pocas células tallo se encargan de mantener constante la hematopoyesis. De acuerdo a recientes estudios, en el ratón joven solo entre el 8 y 10 % de células LH-HSC entran al ciclo celular por día, y las HSC entran al ciclo en un periodo de 1 a 3 meses (Cheshier et al, 1999).

En humano también se han identificado a las células por medio anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie como Sca-1⁺ y H-2K^b, c-kit⁺ CD34⁺, Lin⁻ en ratones y CD34⁺, Thy-1⁺, Lin⁻ en células humanas (Ogawa y Matsunaga, 1999). También se han empleado diversas combinaciones de marcadores, como [Lin^{neg,low}, Thy 1.1^{low}, c-Kit^{high}, Sca 1⁺], [Lin⁻, Thy 1.1^{low}, Sca 1⁺, Rodamina 123^{low}] (Morrison et al, 1995) o [Lin⁻, CD34^{int}, c-Kit⁺, Sca +] (Osawa et al, 1996). Combinaciones similares se han utilizado para identificar células humanas como [Lyn⁻, Thy¹⁺, CD34⁻, CD38^{neg,low}] (Morrison et al, 1995).

Estos marcadores permiten enriquecer la población de células scminales, lo innegable es que las células primitivas hematopoyéticas altamente purificadas provenientes del saco vitelino, hígado fetal, bazo o de médula ósea tienen el potencial de repoblar el tejido hematopoyético (Greenberger, 1991).

Cada célula precursora de linaje comprometida generalmente se le denomina unidad formadora de colonias (CFU ó CFC). Dentro del linaje mieloide se reconoce a las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), las células formadoras de colonias de eosinófilos (Eos-CFC), de basófilos (Mast-CFC), de megacariocitos (Meg-CFC) y la única célula considerada bipotencial que da origen a macrófagos y granulocitos (GM-CFC) (Medvisky, 1993). Aunque algunos estudios sugieren que no existe como tal, sino que es por la producción de citocinas que permiten la generación de cada linaje celular (Mora et al, 1992).

En relación al linaje linfoide se considera que las células pre-T y pre-B derivan directamente de las LT-HSC, aunque algunos investigadores consideran que puede provenir de las CFU-S (Dexter, 1989).

El producto de la proliferación y diferenciación de las células precursoras de linaje comprometidas constituyen el compartimiento de las células maduras hematopoyéticas, normalmente localizadas en la sangre y otros tejidos. Estas células son las responsables del transporte de oxígeno (eritrocitos), producción de plaquetas tan importantes en la

coagulación sanguínea (magacariocitos) y de la inmunidad natural y específica en la eliminación de los agentes patógenos; macrófagos, neutrófilos, basófilos y eosinófilos son los principales constituyentes de la inmunidad natural, mientras que los linfocitos T y B son responsables de la inmunidad específica.

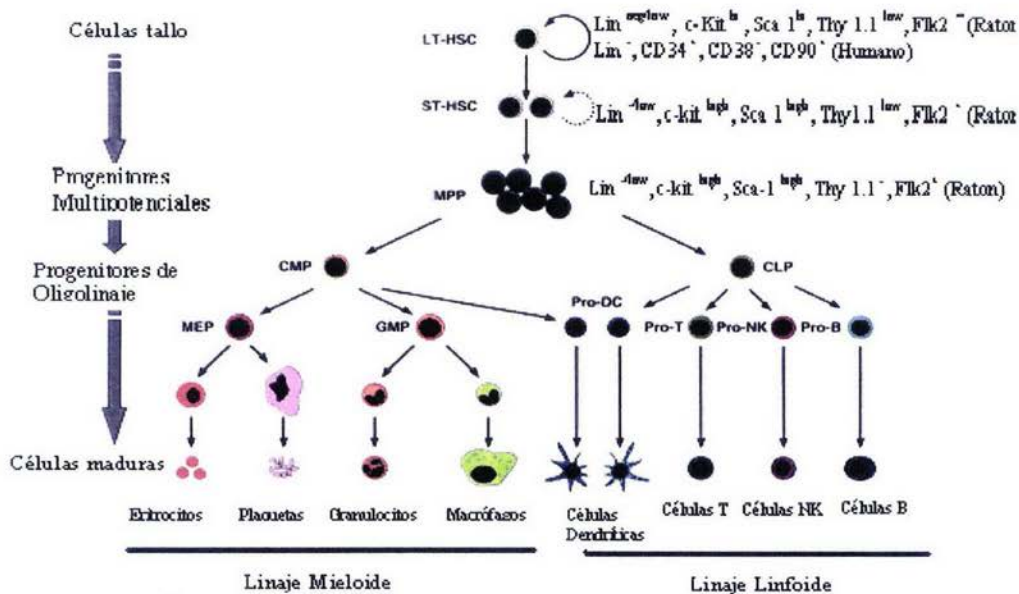


FIGURA 1. Esquema de la generación de las células hematopoyéticas en el ratón adulto y los distintos marcadores que se han utilizado para identificarlas (Tomado de Passegué et al, 2003). LT-HSC, células tallo hematopoyéticas de largo plazo; ST-HSC, HSC de corto plazo; MPP, progenitoras multipotenciales; CMP, progenitor mieloide común; CLP, progenitor linfóide común; MEP, progenitor mieloide; GMP, progenitor mielomonocítico. Pro-DC, progenitor de células dendríticas; Pro-T, pro- de células T; Pro-NK, Pro- de células naturales asesinas; Pro-B, prog- de células B.

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

Existen dos hipótesis para explicar como ocurre la autorrenovación o comprometimiento (diferenciación) de una célula tallo. El modelo determinístico, establece que no cualquier célula seminal sufre un comprometimiento, ya que estas son influenciadas por factores microambientales que las comprometen irreversiblemente a cierto linaje celular. El modelo estocástico menciona que cualquier célula seminal tiene la misma probabilidad de sufrir autorrenovación, o entrar al compartimiento de comprometimiento, las citocinas sólo facilitan la progresión de estos eventos (Morrison et al, 1985).

MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO

Las células precursoras hematopoyéticas, se localizan en el estroma de la médula ósea, dentro del tejido esponjoso del hueso, éste se encuentra rodeado por el hueso cortical. El estroma de la médula ósea, está constituido por células precursoras de la serie blanca y roja, plaquetas y células de grasa (Figura 2).

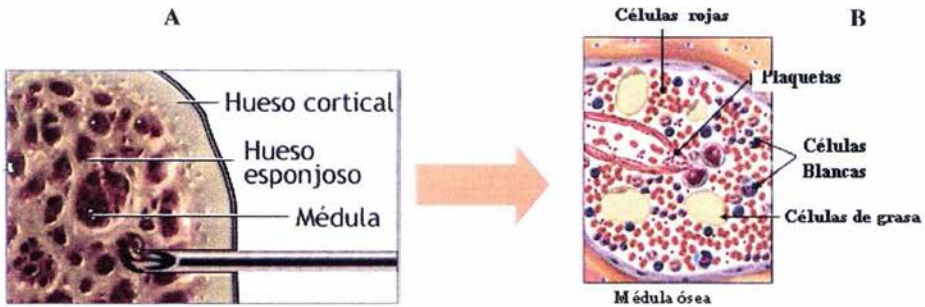


FIGURA 2. En el hueso esponjoso (A) se localiza la médula ósea (B) donde se encuentran las células que dan origen a los diferentes linajes tanto mieloide (serie roja) como linfóide (serie blanca) (Tomado de www.acm.uiuc.edu)

Se considera que este grupo de células y la matriz extracelular constituyen el nicho indispensable para la sobrevivencia, autorreplicación y comprometimiento de las células HSC hacia los diferentes linajes hematopoyéticos (Allen y Dexter, 1990; Metcalf, 1998).

Los cultivos *in vitro* de tejido hematopoyético a largo plazo ha permitido establecer que la hematopoyesis se sostiene debido a que las células integrantes del estroma secretan diversas citocinas tales como Interleucinas (IL) (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-7, IL-13, IL-10 entre otras), factores estimuladores de colonias (CSF por sus siglas en inglés) ya sea de tipo granulocito-macrófago (GM-CSF) o de macrófago (M-CSF) o de granulocito (G-CSF) así

como el factor de células tallo (SCF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento transformante (TGF), e incluso hasta antagonistas de algunas citocinas como el IL-1Ra, (Quesenberry y Levitt, 1979). Lo cual indica la importancia de las células estromales de la médula ósea para soportar una hematopoyesis continua (Clark y Kamen, 1987).

Las citocinas secretadas pueden permanecer en forma soluble o unidas a moléculas de la matriz extracelular (Allen y Dexter, 1990). También se ha encontrado citocinas adheridas a la membrana celular como es el caso de SCF, IL-1 y del M-CSF (Allen y Dexter, 1990). Se ha observado que las células estromales pueden ser afectadas por la presencia de factores externos, así se ha establecido que la adición de IL-3 o GM-CSF favorece el incremento de adipositos acompañado de incremento en la proliferación del linaje monocito-granulocito (Schro et al, 1989).

El soporte de la hematopoyesis por las células estromales de pacientes tratados con quimioterapia en presencia de citocinas, aunque muestra un incremento relativo similar al mostrado por los cultivos de células estromales normales, el número absoluto fue menor (Coutinho et al, 1990), lo cual indica que el estroma reduce su potencial para soportar la hematopoyesis, probablemente por que existe un número menor de células estromales nodrizas para las células seminales hematopoyéticas.

Por otro lado el uso de altas-dosis de quimioterapia para eliminar a las células neoplásicas, implica un mayor riesgo para las células estromales y por lo tanto para el ambiente hematopoyético e incluso puede ser irreversible. Sería conveniente encontrar alternativas de tratamiento para proteger a las células estromales e incluso después del tratamiento aumentar el número de células hematopoyéticas a fin de lograr una recuperación hematopoyética mucho más rápida.

FACTORES DE CRECIMIENTO HEMATOPOYETICO

Las células estromales tienen una participación importante para sustentar la hematopoyesis y destaca su capacidad para producir factores de crecimiento hematopoyético, conclusión obtenida por experimentos *in vitro* de células precursoras hematopoyéticas provenientes de médula ósea de ratón, éstas solo proliferaban en presencia de células estromales o medio condicionado de estas mismas (Pluznik y Sachs, 1965).

Más tarde se demostró que la proliferación de células precursoras se debía a factores glicoprotéicos presentes en el exudado. Los factores obtenidos de los diferentes tipos celulares, mostraban mayor actividad sobre un linaje en particular; el factor proveniente de medio condicionado de fibroblastos induce la formación de colonias de monocito-macrófago. El de macrófago induce la formación de colonias de granulocitos, y el de epitelio induce la formación de colonias de granulocito-macrófago (Metcalf y Burgess, 1982).

Por sus propiedades, este tipo de moléculas recibieron el nombre de factores estimuladores de colonias (CSF). Para la denominación de cada factor se antepuso la letra inicial del grupo de células blanco, el factor que origina a los macrófagos se le conoce como M-CSF, el de granulocitos G-CSF y el de granulocitos-macrófagos GM-CSF (Davis et al, 1996).

La identificación del factor que induce la proliferación de varios linajes celulares incluyendo eosinófilos, eritrocitos, basófilos, megacariocitos, granulocitos-neutrófilos y monocito-macrófagos se le denominó multi-CSF también conocido como IL-3 (Metcalf y Burgess, 1982; Rifkind et al, 1976). Cabe señalar que al GM-CSF, G-CSF y M-CSF también se le conoció como inductor de macrófagos y granulocitos-1 (MGI-1) (Lotem y Sachs, 1985).

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

proliferación y diferenciación de las células precursoras comprometidas e incluso de células tallo pluripotenciales, también de aquellos que regulan de manera negativa la proliferación, actualmente se conocen más de treinta factores, algunos de los cuales se muestran adelante.

Brevemente, entre las citocinas hematopoyéticas tenemos a la eritropoyetina (EPO) específico para la generación de eritrocitos (Dexter, 1989). El factor de células tallo (SCF), es una citocina que favorece la sobrevivencia y proliferación de las células seminales (Zsebo et al, 1990) también se ha caracterizado otro factor el ligando fl3, el cual muestra una actividad reducida en células tallo, pero sinergiza la actividad de otras citocinas (Rosnet et al, 1993).

Las citocinas que modulan la actividad hematopoyética se han dividido, por su efecto biológico y características moleculares, en varias familias; factores de crecimiento, interleucinas, e interferones (Cuadro 1).

| Familia | Molécula | Origen | Destino |
|--------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Factores de crecimiento | GM-CSF | Linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos | Macrófagos, Neutrófilos y Eosinófilos |
| | G-CSF | Macrófagos y fibroblastos | Neutrófilos |
| | M-CSF | Macrófagos, fibroblastos y células endoteliales | Macrófagos |
| | EPO | Riñón | Eritrocitos |
| | SCF | | Progenitores mieloides y linfoides |
| Interleucinas | IL-1 | APCs | Linfocitos T y B |
| | IL-2 | LTH1 | Linfocitos T, B y células NK |
| | IL-3 | LTH | Células progenitoras multipotenciales |
| | IL-4 | LTH2 | Linfocitos T y B |
| | IL-5 | LTH2 | Eosinófilos |
| | IL-6 | MAC | Megacariocitos, Linfocitos T y B |
| | IL-7 | Estroma de médula ósea | Precursores B y T, células NK |
| | IL-8 | Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos | Quimiotaxis de neutrófilos |
| | IL-9 | TH | Activa proliferación de TH |
| | IL-10 | TH2 | Inhibe Respuesta inmune |
| | IL-11 | | Células progenitoras hematopoyéticas |
| | IL-12 | | Aumenta la proliferación de células hematopoyéticas |

| Familia | Molécula | Origen | Destino |
|----------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Interleucinas | IL-13 | | Linfocitos B |
| | IL-14 | | Linfocitos B |
| | IL-15 | | Linfocitos T |
| | IL-16 | | Quimiotaxis de linfocitos |
| | IL-17 | | Estimula células estromales |
| | IL-18 | | Induce producción de IFN- γ en células T y NK |
| Interferones | IFN-α | Linfocitos B, células NK | Actividad antitumoral y antiviral |
| | IFN-β | Fibroblastos | Aumenta actividad NK |
| | IFN-γ | Células NK, y T | Activa macrófagos |
| Factores de necrosis tumoral | TNF-α | Linfocitos T, B, células NK, neutrófilos | Efectos diversos sobre células epiteliales |
| | TNF-β | Linfocitos T | Estimula a neutrófilos |
| Factores de crecimiento transformante | TGF-α | | Fibroblastos |
| | TGF-β | Linfocitos T | Inmunosupresor |

CUADRO 1. Citocinas que regulan la actividad hematopoyética (Tomado de Davis et al. 1996).

BAZO Y HEMATOPOYESIS

Es sabido que la médula ósea es el órgano hematopoyético primario que reúne todas las características y cuenta con el microambiente necesario para la producción de células sanguíneas (Dorshkind, 1990), no obstante, el bazo juega un papel muy importante en la hematopoyesis secundaria y puede llegar a ser fundamental (Begg et al, 1993). Se ha demostrado que participa de manera determinante en la reconstitución hematopoyética de ratones letalmente irradiados (Till y McCulloch, 1961). También se ha encontrado que las células que forman colonias en bazo contienen el espectro completo de células mieloides (Worton y McCulloch, 1969; Magli et al, 1992), esto es confirmado por el hallazgo de células hematopoyéticas primitivas en este órgano. La hematopoyesis extramedular en los órganos hematopoyéticos en particular bazo, refleja la propiedad de las células hematopoyéticas inertes de volverse activas si son estimuladas (Nilsson y Bertencello, 1994). Así el bazo es un órgano que puede participar de manera activa en la hematopoyesis, llegando incluso a suplir las funciones de la médula ósea. (Williams et al, 1983).

El bazo se ubica en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, bajo el diafragma y a la izquierda del estómago (Miales, 1985) (Figura 3). Este se desarrolla a partir de la proliferación de células mesodérmicas situadas entre las hojas del gástrico dorsal (Langman, 1986).

El bazo está recubierto por una cápsula de tejido conectivo y una extensa red de trabéculas ramificadas lo divide en compartimentos comunicados (McKenzie, 1991). El parénquima se compone de la pulpa roja y la pulpa blanca (Weiss, 1963). La pulpa blanca en su mayor parte se compone de linfocitos, es una zona blanca grisáceo dentro del cual se encuentran los centros germinales y la vaina linfática periarterial. Es en la pulpa blanca donde inicia la respuesta inmunitaria, llevada a cabo en los centros germinales donde además de linfocitos B, y T, también se encuentran células NK, granulocitos (Weiss, 1972), y células dendríticas (Fujii et al, 1999).

En algunos casos en que la actividad inmunitaria está amplificadā, la pulpa blanca puede aumentar hasta ocupar la mitad del volumen del 6rgano, que en forma normal ocupa el 20% o menos sin que esto represente necesariamente alguna patologīa (Weiss, 1964; Weiss, 1977).

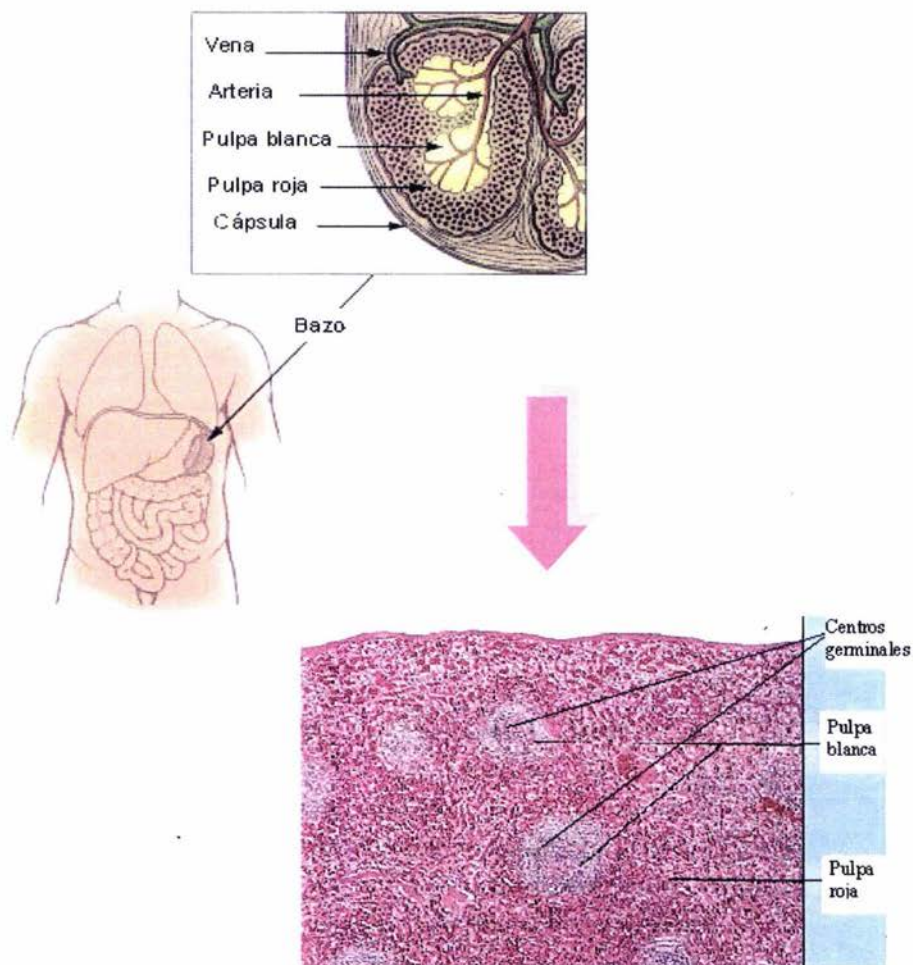


Figura 3. Ubicación del bazo y centros germinales (Tomado de www.acm.uiuc.edu).

La pulpa roja contiene principalmente arterias derivadas de la arteria central y senos venosos, su función principal es la irrigación sanguínea en ambas zonas la pulpa roja y blanca. El color rojo es causado por la presencia de eritrocitos, la sangre que se vacía en la pulpa blanca y la zona marginal toma la vía de tránsito lento esta vía es muy importante para la función del bazo ya que elimina eritrocitos seniles o dañados, e interviene en la defensa inmunitaria (Nossal, 1966).

En tanto que la vaina linfática periarterial se compone por vasos sanguíneos que se encargan de delimitar e irrigar ambas zonas tanto pulpa blanca como pulpa roja (Eraklis et al, 1967).

CASEINAS Y HEMATOPOYESIS

La leche contiene una gran cantidad de proteínas, dentro de las cuales las caseínas son las principales (75-80 %) (Meisel, 1997). La caseína se compone de micelas integradas por cuatro cadenas polipeptídicas α_{s-1} , α_{s-2} , β y κ caseínas (Eigel, 1984).

El caseinato de sodio (CasNa) es una sal de las caseínas, éste se obtiene disolviendo caseína en hidróxido de sodio, el resultado es un polvo blanco sin sabor, ni olor, soluble en agua y con un 65% de proteínas, por lo cual es extensamente utilizado en la industria alimenticia (Walstra y Jenneis, 1984).

Dentro del campo de la investigación biomédica se ha observado que una dieta baja en caseínas incrementa la posibilidad de presentar tumores en colon de ratas Wistar (Tatsuta et al, 1992), mientras que una dieta rica en caseínas protege contra el desarrollo de cáncer intestinal en ratas (McIntosh et al, 1995). Por otra parte hay estudios que indican que la inyección de caseína en ratas eleva la producción de anticuerpos (Wong et al, 1996). Lo anterior muestra que las caseínas pueden regular al sistema inmune.

Por otro lado, se ha mostrado que la inyección de CasNa en cavidad peritoneal induce la acumulación de granulocitos y macrófagos en la cavidad peritoneal de ratones y peces (Passoti et al, 1993; Aranishi et al, 1997). También se ha observado que la inyección intraperitoneal de CasNa en ratones, eleva la concentración del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (G-CSF y M-CSF) (Lotem y Sachs, 1985) en suero y exudado de cavidad peritoneal, asimismo se ha observado la presencia de GM-CSF en suero de ratones (Metcalf et al, 1996).

Nuestro grupo ha mostrado que el CasNa acelera la transición de granulocitos en banda a polimorfonucleares en forma similar al G-CSF además de que induce la liberación de M-CSF en granulocitos (Bautista, 1998), adicionalmente induce la diferenciación de las

células hematopoyéticas multipotenciales 32D (una línea utilizada como modelo de estudio de la hematopoyesis normal) hacia el linaje monocito-macrófago (Ramos, 1999).

El CasNa induce la expresión del gen del M-CSF en las células 32D, un dato muy interesante es que se ha demostrado que el CasNa induce la proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratón *in vitro*, lo cual sugiere que las caseínas regulan la hematopoyesis *in vitro*.

Experimentos *in vivo* revelan que una dieta baja en caseínas reduce los niveles de eritropoyetina, el mayor regulador fisiológico de la eritropoyésis en suero, asimismo disminuye el número de células formadoras de colonias eritroides (CFU-E) en bazo (Okano et al, 1992), mostrando con esto la gran sensibilidad del bazo para cualquier cambio en los niveles de caseínas. También se ha reportado que una dieta libre de caseína provoca una reducción en el peso de los ratones cercano al 24 % así como modificaciones al microambiente hematopoyético debido a alteraciones en la estructura de la matriz extracelular en médula ósea (Vituri, 2000). Así este conjunto de datos sugieren la posibilidad de que el CasNa pueda regular la hematopoyesis *in vivo*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se demostró que el CasNa modula positivamente la hematopoyesis *in vitro*, pero se desconoce si esta molécula hace lo mismo *in vivo*. El presente trabajo tiene como finalidad mostrar si el CasNa activa la hematopoyesis *in vivo*, empleando como modelo de estudio a los ratones BALB-c.

JUSTIFICACIÓN

Los decesos en México debido a tumores malignos ocupa uno de los primeros 5 principales causas de muerte. Entre los tumores malignos las leucemias (una hematopoyesis anormal) provocan el mayor número de muertes con el 1.2% en 1999, incluso por arriba de los tumores malignos del cuello uterino que representan el 0.4 % (Secretaría de Salud, 2000). En el año 2000, las leucemias fueron la segunda causa de mortalidad en edad escolar (5 a 14 años), con un 13 %. Esta tendencia se mantuvo en el 2001, ocupando nuevamente el segundo lugar de mortalidad solo después de los accidentes automovilísticos (INEGI/Secretaría de Salud/CONAPO, 2002; Secretaría de Salud, 2002). Por lo anterior, es importante la investigación dentro del campo de la hematología que permita conocer nuevas opciones de regulación de la hematopoyesis normal y evaluar la posibilidad de que estos conocimientos puedan ayudar a encontrar alternativas para solucionar problemas de una hematopoyesis anormales como el caso de la leucemia.

Los tratamientos antitumorales involucran el uso de metabolitos que bloquean la proliferación de células tumorales y normales, incluyendo a las células hematopoyéticas (importantes en la defensa inmune) por lo que comprometen inmunológicamente al paciente. Recientemente hemos mostrado que el caseinato de sodio (CasNa) activa la hematopoyesis normal *in vitro*, pero se desconoce si también ocurre *in vivo*, dato que es de utilidad para pensar en una alternativa que pueda inducir recuperación hematopoyética en pacientes mielosuprimidos.

HIPÓTESIS

Se sabe que el caseinato de sodio (CasNa), induce el aumento en el número de células mononucleadas de médula ósea de ratón *in vitro*. Por la tanto, se espera que al ser inyectado en ratones BALB-c active la hematopoyesis *in vivo*, incrementando el número de células mononucleadas en médula ósea e induciendo la hematopoyesis extramedular en bazo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del caseinato de sodio (CasNa) en la hematopoyesis *in vivo* de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar si existe cambios en el número de células mononucleadas de médula ósea de ratones inyectados o no con caseinato de sodio (CasNa), durante siete, catorce y veintiocho días.

Evaluar si existe aumento en el tamaño del bazo, como índice de hematopoyesis extramedular en ratones inyectados o no con CasNa, durante siete, catorce y veintiocho días.

METODOLOGÍA

ANIMALES

Se utilizaron ratones hembras BALB-c (obtenidos del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza), de tres a cuatro meses de edad, criados en condiciones de esterilidad, con agua y comida *ad libitum*, éstos se dividieron en dos grupos uno fue inyectado con CasNa y el otro con solución estabilizadora de fosfatos (PBS), ambos grupos se mantuvieron bajo las mismas condiciones durante el transcurso de los experimentos.

CASEINATO DE SODIO

El caseinato de sodio (CasNa) (Difco, USA), se utilizó al 10% (p/v) disuelto en PBS y previamente esterizado en autoclave por 20 minutos, al igual que el vehículo. Se inyectó 1 ml de CasNa o de PBS en la cavidad peritoneal del ratón cada 48 horas por un periodo de siete, catorce y veintiocho días.

OBTENCIÓN DE CELULAS MONONUCLEADAS

Después de siete, catorce y veintiocho días se sacrificaron los ratones por medio de dislocación cervical para obtener los fémures, esto se realizó en una campana de cultivo, previamente desinfectada con etanol al 70% y se esterilizó durante 20 minutos con luz ultravioleta, los fémures se colocaron en cajas petri con medio Iscove's Modified Dulbecco's (Gibco BRL, USA).

El fémur se perforó en ambas epífisis, con una jeringa de 1 ml se hizo fluir medio Iscove's suplementado con suero fetal bovino al 15% (SFB, Hyclon USA) para extraer las células totales de médula ósea, la suspensión celular se centrifugó para obtener el botón celular. Este se resuspendió en 2 ml de Iscove con suero fetal bovino (SFB) al 15%. Enseguida se paso por un gradiente de densidad con Ficoll 1.077 g/ml (Microlab, México), por 30 minutos a 500 g. (Boyum, 1968).

Al finalizar este periodo se obtiene un anillo celular el cual contiene a las células mononucleadas, éste se extrajo y se lavó dos veces con Iscove y SFB (15%), finalmente se realizó el conteo celular.

VIABILIDAD Y NÚMERO CELULAR

La viabilidad celular fue evaluada por medio de la incorporación de azul tripano (Sigma, USA), para lo cual se agregó una proporción 1:1 y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, después se contaron células vivas y muertas (teñidas con azul tripano) en un hemacitometro (Boeckel, Alemania).

CORTES HISTOLÓGICOS

El bazo fue retirado de los ratones después de siete, catorce y veintiocho días de tratamiento, se colocó en PBS se midió el largo y ancho, con una regla. Posteriormente se fijaron en formalina estabilizada al 10% con pH 7.4, por un periodo de 12 a 24 horas. Posteriormente se retiró la solución de formalina, se rescataron los bazos estos se colocaron en rejillas y se depositaron en formol para su inclusión en parafina. Por medio de un procesador de tejidos automatizado (Histoquinet, Leica, USA) se deshidrataron los bazos progresivamente con un gradiente de etanol al 50%, 75%, 96% y absoluto pasando a xilol como paso final. Una vez concluido el tiempo, se continuó con la inclusión de los bazos en parafina (Incluidor de parafina EG 1160 Leica, USA), disminuyendo gradualmente la temperatura hasta obtener los bloques de parafina con los bazos incluidos (2 cm²). Por último los bloques fueron cortados en un micrótopo (Minot, Alemania) donde se obtuvieron cortes de 5 µm (González 1996) y fueron teñidos con hematoxilina-eosina para su observación en microscopio óptico.

TINCIÓN HEMATOXILINA-FOSINA

- I. Se dejan secar los cortes (24 h mínimo)
- II. Desparafinar con xilol, con dos cambios, el primero de 30 min. y de 10 min. el segundo.
- III. Limpiar el xilol, con alcohol 96° de cada lámina, y limpiar con gasa los costados y la parte posterior del porta-objeto.
- IV. Colocar en agua destilada por 5 min.
- V. Escurrir el excedente de agua.
- VI. Se coloca en la solución de hematoxilina de Mayer por 10 min.
- VII. Escurrir el excedente de hematoxilina.
- VIII. Se coloca en agua corriente, se hacen dos cambios de 10 min. cada uno.
- IX. Escurrir el excedente de agua.
- X. La tinción con Eosina debe realizarse por cada lámina, de 1 a 2 min.
- XI. Limpiar 2 veces con alcohol 96° cada porta-objeto, y limpiar con gasa.
- XII. Se coloca en carbón-xilol por 5 min. para aclarar.
- XIII. Cambiar el xilol para montar
- XIV. Se utiliza el bálsamo de Canadá para fijar el cubre objeto a cada lámina
- XV. Se dejan secar las láminas, por varios días, antes de guardar.

MEDICIÓN DE LOS CENTROS GERMINALES

La medición de los centros germinales se realizó con los cortes obtenidos de bazo, con la ayuda de un ocular micrométrico (125x) se midieron (a partir de, y hasta la membrana basal del centro germinal) el diámetro mayor de al menos 20 centros germinales en cada corte histológico de los tres grupos (7,14 y 28 días), esto se repitió para cada uno de los tres tratamientos (Ben-Hur et al, 1999; Romppanen 1981; Goodland 1995).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron tres experimentos independientes, con dieciocho ratones en total, seis ratones por cada grupo. Se utilizó el programa SPSS versión estándar para Windows 11.0 (2001) para analizar los datos con la prueba t de student con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

LA INYECCIÓN DE CasNa INCREMENTA EL NÚMERO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS EN MÉDULA ÓSEA DE RATÓN.

Se ha mostrado *in vitro* que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína, activa la hematopoyesis al inducir el aumento en el número de células mononucleadas en médula ósea de ratón (Lagunes et al, 2001). Con la finalidad de mostrar si éste efecto, también ocurre *in vivo* se inyectó CasNa en la cavidad peritoneal de ratones BALB-c (1 ml al 10% en PBS) cada cuarenta y ocho horas por 7, 14 y 28 días. Después de 7 días de tratamiento, la inyección de CasNa provocó un aumento significativo en el número de células mononucleadas en médula ósea respecto al grupo testigo inyectado con solo vehículo, diferencia que es mantenida a los 14 y se incrementa notablemente a los 28 días (Figura 4).

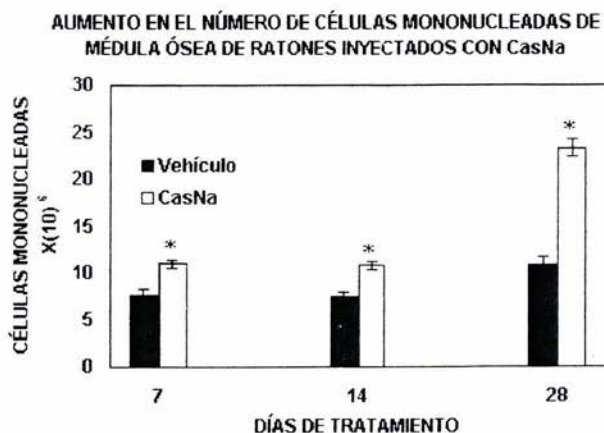


Figura 4. A partir de los primeros siete días se incrementa significativamente (* t student con $P < 0.05$) el número de células mononucleadas en animales inyectados con CasNa. está se mantiene a los catorce y aumenta aún más a los veintiocho días.

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

Previos estudios *in vitro* mostraron que no existe alteración en la viabilidad de las células mononucleadas tratadas con CasNa por 7 días (Lagunes et al, 2001). Para confirmar si esto también ocurre *in vivo*, se utilizó la prueba de exclusión de azul tripano en células mononucleadas obtenidas de ratones inyectados o no, con CasNa durante 7, 14 y 28 días. Los resultados en estos experimentos muestran una viabilidad celular mayor al 90 %, independientemente del tratamiento (Figura 5).

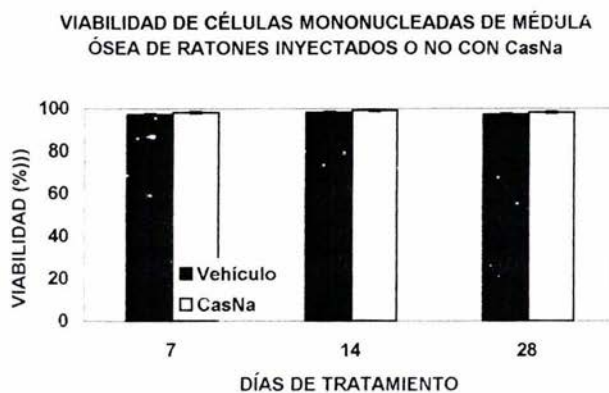


Figura 5. La administración de CasNa vía intraperitoneal, no altera la viabilidad de las células mononucleadas de médula ósea.

EL CasNa NO ALTERA EL PESO DE LOS RATONES DURANTE EL TRATAMIENTO

Debido a que el caseinato de sodio (CasNa) es un agente proinflamatorio (Baltz et al, 1980) y la inflamación reduce el peso de los ratones (Gallin et al, 1974), se procedió a evaluar si la inyección en la cavidad peritoneal con CasNa durante el tratamiento por 28 días, afectaba el peso de los ratones. Los resultados indican que este compuesto no altera el peso de los animales tratados con CasNa o con vehículo (PBS) (Figura 6).

EL CasNa NO ALTERA EL PESO DE LOS RATONES DURANTE EL TRATAMIENTO

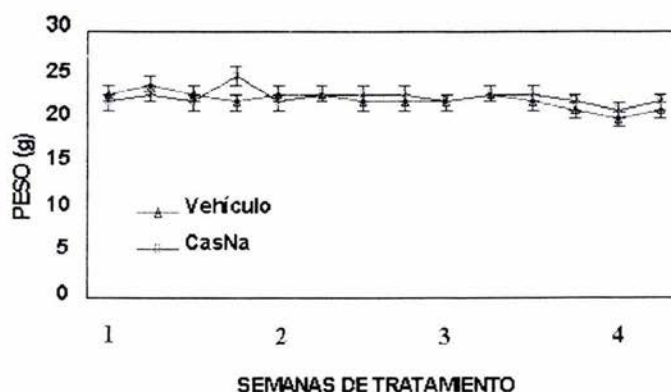


Figura 6. Peso de los ratones inyectados o no, con CasNa cada 48 horas durante 28 días.

EL CasNa INCREMENTA EL TAMAÑO DEL BAZO

Se ha mostrado que la activación de la hematopoyesis extramedular en bazo, comúnmente se ve reflejada por el incremento en el tamaño y peso de este órgano (Nilsson y Bertocello, 1994). Por lo cual se extrajo este órgano, para observar si había alguna diferencia en tamaño y peso. Durante los primeros 7 días de tratamiento con CasNa no hubo cambio, en estos parámetros. Sin embargo, a los 14 días el bazo de animales tratados muestra un aumento en la longitud y un incremento significativo en peso, diferencia que se acentúa a los 28 días (Figura 7) y (Cuadro 2).

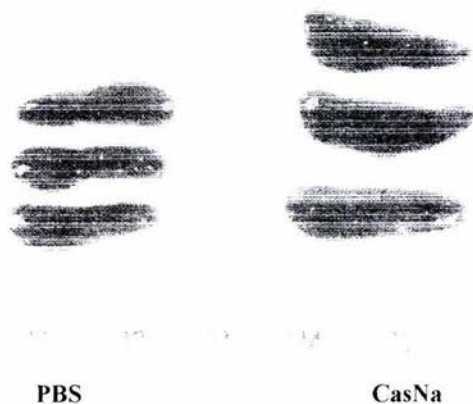


Figura 7. El bazo de ratones tratados con CasNa por 28 días aumento considerablemente en tamaño (cm).

| Dimensiones y peso del bazo en ratones tratados o no, con CasNa durante 7, 14 y 28 días. | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------|-----------|------------|
| Días de tratamiento | | 7 | 14 | 28 |
| Peso(g) x±de | PBS | 0.15±0.01 | 0.15±0.01 | 0.18±0.02 |
| | CasNa | 0.15±0.02 | 0.25±0.01 | 0.28±0.03* |
| Largo(cm) x±de | PBS | 1.4±0.4 | 1.4±0.01 | 1.5±0.2 |
| | CasNa | 1.5±0.5 | 1.6±0.4 | 1.7±0.07 |
| Ancho(cm) x±de | PBS | 0.4±0.02 | 0.4±0.05 | 0.5±0.02 |
| | CasNa | 0.5±0.03 | 0.5±0.05 | 0.6±0.03 |

CUADRO 2. El aumento en peso del bazo fue significativamente diferente (* t student con $P < 0.05$) a los 14 y 28 días de tratamiento con CasNa. x±de, media mas menos desviación estandar.

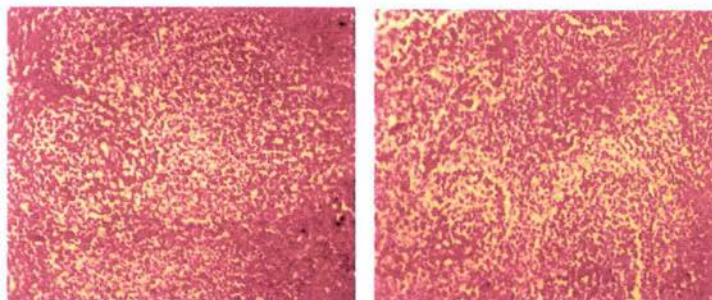
Para corroborar el crecimiento del bazo se realizó el índice esplénico (peso bazo/peso ratón), este aumento se da como anteriormente se observó a partir del día 14, y es mayor al día 28.

| INDICE ESPLÉNICO DE RATONES TRATADOS A NO, CON CasNa | | | |
|-------------------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|
| Tratamiento | 7 | 14 | 28 |
| CasNa | 0.0067 | 0.0107 | 0.0125 |
| PBS | 0.0065 | 0.0066 | 0.0083 |

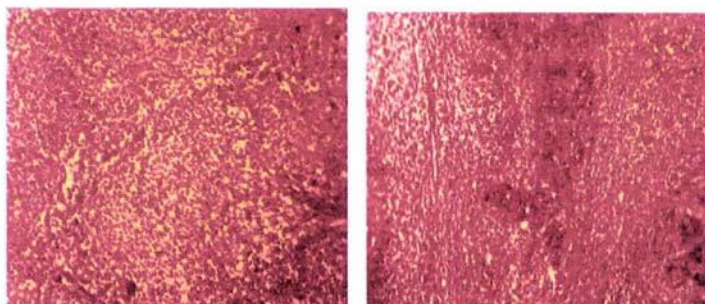
CUADRO 3. El índice esplénico muestra el aumento del bazo a partir de los 14 días, este se incrementa aún más al día 28 de tratamiento con CasNa, no así el grupo testigo.

EL CasNa INDUCE AUMENTO EN EL TAMAÑO DE LOS CENTROS GERMINALES

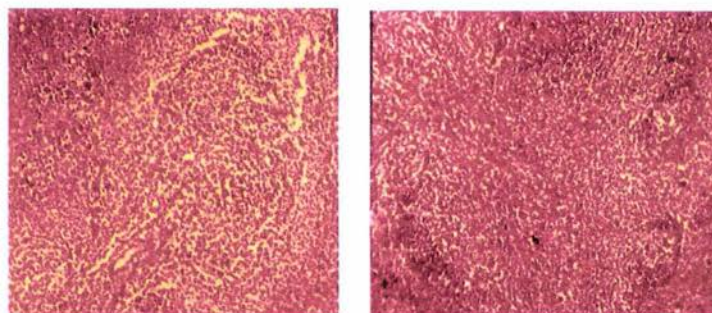
Otro parámetro para detectar hematopoyesis extramedular es el incremento en la extensión de los centros germinales (Langevoort, 1963). A fin de observar si el aumento en tamaño del bazo, inducido por el CasNa activa la hematopoyesis extramedular, se extrajeron los bazos y se realizaron cortes y tinciones histológicas para determinar si ocurrían cambios en los centros germinales. En los primeros 7 días no existen diferencias en la densidad celular o cambio en el tamaño de los centros germinales de animales con o sin tratamiento (Figura 8A).



(A) A 7 días de tratamiento



(B) A 14 días de tratamiento



(C) A 28 días de tratamiento

Vehículo

CasNa

Figura 8. El CasNa no incrementa la densidad celular en los centros germinales de bazo a los 7 días (A) de tratamiento, pero si a los 14 (B) y contundentemente a los 28 días (C) (x40).

En el grupo de 14 días tratado con CasNa se aprecia mayor densidad celular en los centros germinales, otra diferencia importante es que el tamaño de los centros germinales aumento con relación a su testigo (Figura 8B), mientras que a los 28 días las diferencias se acentúan considerablemente (Figura 8C).

Tomando en cuenta que el incremento en el tamaño de los centros germinales fue considerable al final del tratamiento. Se procedió a medir el diámetro mayor de los centros germinales en ambos grupos.

Los resultados muestran que, el diámetro de los centros germinales fue significativamente diferente solo a los 28 días. (Figura 9).

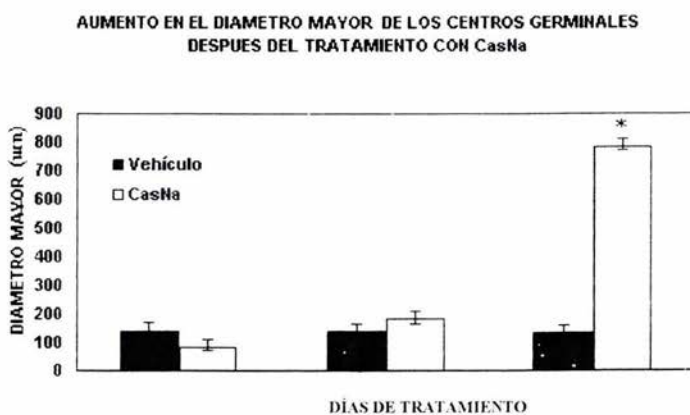


Figura 9. El tamaño de los centros germinales en bazo de ratones tratados con CasNa aumentó significativamente a los 28 días de tratamiento (* t student con $P < 0.05$).

DISCUSIÓN

La hematopoyesis es regulada por una serie de mensajeros celulares conocidos como factores de crecimiento hematopoyético, miembros de la familia de citocinas, aunque también existen otras biomoléculas que pueden modular la hematopoyesis *in vitro* e *in vivo*, como es el caso del ácido retinoico el cual se emplea actualmente para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (Pendino et al, 2003).

Recientemente nuestro grupo aportó evidencias de que el caseinato de sodio (CasNa), una sal de la caseína (Hall, 1971), modula la hematopoyesis *in vitro* (Ramos, 1999). En este trabajo se aportan evidencias de que el CasNa modula la hematopoyesis *in vivo*.

La inyección con CasNa via intraperitoneal en ratón eleva significativamente el número de células mononucleadas en médula ósea, parámetro que indica activación de la hematopoyesis *in vivo* (Donahue, 1986).

La activación de la hematopoyesis *in vivo* por el CasNa no se restringe a la médula ósea ya que también induce incremento en peso y tamaño del bazo, corroborado por el índice esplénico, así como del diámetro mayor de los centros germinales (Figuras 7, 8, 9 y Cuadro 2 y 3), tres parámetros empleados para evidenciar hematopoyesis extramedular (Takeshi et al, 2003; Begg et al, 1993; Langevoort, 1963).

La estimulación de la hematopoyesis en médula ósea se evidenció desde los primeros 7 días de estudio con CasNa y se sostuvo hasta los 28 días sin afectar la viabilidad celular, mientras que la hematopoyesis extramedular en bazo, solo se evidenció después de 14 y en forma contundentemente a los 28 días, lo cual sugiere que el CasNa activa lentamente la hematopoyesis extramedular, en forma similar a lo observado en animales deficientes en vitamina E, donde la ausencia de esta vitamina induce una hematopoyesis extramedular en bazo (Takeshi et al, 2003).

Aunque el aumento del número de células mononucleadas en médula ósea, tamaño, peso y diámetro mayor de los centros germinales en bazo, son parámetros que indican actividad hematopoyética *in vivo* (Takeshi et al, 2003; Begg et al, 1993; Langevoort, 1963), sería recomendable realizar estudios en ensayos de agar para revelar diferencias en el número de unidades formadores de colonias en ratones tratados o no, con CasNa así como evaluar la incorporación de timidina tritiada como índice de síntesis de ADN, no sólo para reafirmar que el CasNa activa la hematopoyesis *in vivo*, sino que también para evaluar el tiempo de estímulo mínimo necesario para inducir este efecto.

Por otro lado, se conoce que la administración de agentes inflamatorios se traduce en una reducción del peso de los ratones inyectados (Gallin et al, 1974). El CasNa ha sido empleado como un agente pro-inflamatorio (induce la acumulación de granulocitos y macrófagos en la cavidad peritoneal de ratones y peces) (Passoti et al, 1993; Aranishi et al, 1997), sin embargo, no detectamos diferencias en el peso de los animales tratados con o sin CasNa, tampoco detectamos alteraciones en la viabilidad celular, lo cual indica que el CasNa no se comporta como un factor pro-inflamatorio clásico.

Esta aseveración parece ser apoyado por el hecho de que el perfil de citocinas inducida en suero y fluido peritoneal de ratones inyectados con LPS y tioglicolato (dos clásicos pro-inflamatorios), son diferentes en tipo y vida media de aquellos inducidos por el CasNa (Watari et al, 1989; Metcalf y Nicola 1995; Lotem y Sachs 1985), además la inyección de caseína en ratones no induce la expresión de interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 beta (IL-1b) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), tres citocinas proinflamatorias clásicas (Noursadeghi et al, 2002).

Así, este conjunto de datos sugiere que el CasNa y las caseínas merecen un análisis más profundo para reconsiderarlas como moléculas inflamatorias, donde el análisis de perfil de citocinas pro-inflamatorias puede ser de gran utilidad con lo cual se dará indicio del potencial biomédico de este factor.

Hasta el momento se desconoce el mecanismo por medio del cual el CasNa activa la hematopoyesis *in vivo*, sin embargo, es conocido que la inyección intraperitoneal de CasNa en ratones, eleva la concentración de factores estimuladores de colonias tipo G-CSF y M-CSF en suero y fluido de cavidad peritoneal (Lotem y Sachs 1985), así como de GM-CSF en suero de ratones (Metcalf et al, 1996), tres citocinas con reconocida actividad estimuladora de la hematopoyesis.

Por otro lado, se ha mostrado que el CasNa induce la liberación de M-CSF en granulocitos (Bautista, 1998) y la expresión del gen de este mismo factor en las células 32D (Ramos et al, 2003). Este conjunto de datos sugiere que el CasNa puede modular la hematopoyesis vía inducción a la producción de citocinas, aunque para su confirmación será pertinente detectar el tipo de factor hematopoyético en suero de los ratones tratados con CasNa.

Llama la atención que el incremento del número de células mononucleadas en médula ósea en ratones tratados con CasNa, es similar al reportado en monos después de la inyección del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF por sus siglas en inglés) (Donahue, 1986), una citocina con reconocida actividad hematopoyética y que incluso se emplea para inducir recuperación hematopoyética en pacientes mielosuprimidos (Sachs, 1996), lo cual sugiere que el CasNa puede tener un uso clínico potencial similar al GM-CSF, aunque para ello es necesario analizar comparativa y simultáneamente el efecto de ambas moléculas.

Se ha mostrado que el CasNa, *in vitro*, induce la diferenciación macrofágica (Ramos, 1999) y granulocítica (Bautista, 1998), dos poblaciones que integran una de las primeras barreras inmunológicas innatas e importantes en la presentación de antígenos, además, *in vivo*, induce un incremento del tamaño de los centros germinales los cuales están constituidos por linfocitos B, T, células naturales asesinas (NK) y células dendríticas (Chaplin, 2002), todas importantes en la activación de la respuesta inmune específica, lo cual sugiere que el CasNa puede tener gran relevancia en la activación inmune.

Por lo anterior sería importante tipificar que población celular en médula ósea y bazo está proliferando y así tener una mejor aproximación de efecto del CasNa en el sistema inmune. Lo cual puede ser importante, si se considera que existe un estudio donde se revela que la inyección de caseína en ratas eleva la producción de anticuerpos (Wong et al, 1996).

También se ha observado que ciertos fosfopéptidos derivados de la caseína bovina como la α -s1 caseína (fragmento 59-79) y la β -caseína (fragmento 1-25) estimulan significativamente la producción de inmunoglobulinas en cultivos de células de bazo de ratón (Hata et al, 1998). Considerando que el CasNa se compone de α , β y κ caseínas, esto nos sugiere que el CasNa puede actuar activando el sistema inmune.

Por otro lado, existe la posibilidad de que el CasNa pueda inhibir el desarrollo de tumores sólidos, ya que una dieta baja en caseínas aumenta la incidencia de tumores de colon (Tatsuta et al, 1992), y por el contrario una dieta rica en caseínas protege contra el desarrollo de cáncer intestinal en ratas (McIntosh et al, 1995), datos que apoyan la hipótesis de que el CasNa puede tener relevancia fisiológica en el control de problemas oncológicos y abre la necesidad de estudiar si por vía gástrica, el CasNa también activa la hematopoyesis, al igual que por vía intraperitoneal como se muestra en este trabajo.

Finalmente, el CasNa, al actuar como quimioatrayentes sobre granulocitos-neutrófilos y monocitos-macrófagos, en cavidad peritoneal de ratón (Lotem y Sachs 1985; Passoti, 1993), acelerar la transición de granulocitos en banda a polimorfonucleares en forma similar al G-CSF (Bautista 1998), al inducir la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D hacia el linaje monocito-macrófago (Ramos, 1999) y estimular la proliferación de células mononucleadas de médula ósea de ratón *in vitro*, aunado a la activación de la hematopoyesis *in vivo* (Lagunes et al, 2001). Nos permite, mostrar que el CasNa es molécula con innegable actividad hematopoyética sin ser una citocina.

Sería interesante, analizar si su efecto positivo en la hematopoyesis normal se mantiene en la hematopoyesis leucémica. Datos previos indican que el CasNa suprime la hematopoyesis

leucémica, pero no la normal, de confirmarse esta observación sería una molécula interesante en el contexto de la terapia ya que puede emplearse como una estrategia de purga de médula ósea en pacientes leucémicos, lo cual evitaría la necesidad de trasplante de células de médula ósea, y en el mejor de los casos del uso de radio y quimioterapia con indudable incremento de la calidad de vida de los pacientes.

CONCLUSIONES

La inyección de CasNa via intraperitoneal, incrementó el número de células mononucleadas en médula ósea, sin afectar la viabilidad celular. Además, aumento el peso, y tamaño del bazo, confirmado por un mayor índice esplénico. Los cortes histológicos de bazo permiten observar que los centros germinales de animales tratados con CasNa, aumentan en tamaño y densidad celular, evidencias de claras de que el CasNa activa la hematopoyesis *in vivo*.

APÉNDICE

I. INACTIVACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO (SFB)

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

II. PREPARACIÓN DEL COLORANTE AZUL DE TRIPANO

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

III. SOLUCIÓN ESTABILIZADORA DE FOSFATOS (PBS)

Esta solución fue utilizada como vehiculo del Cas Na, las sales de fosfatos proporcionan la capacidad estabilizadora a esta solución, esta se compone de;

| | |
|-----------------------------------------------|--------|
| Cloruro de magnesio (Sigma, Chem, USA) | 0.10 g |
| Cloruro de calcio (Sigma, Chem, USA) | 0.10 g |
| Cloruro de sodio (Sigma, Chem, USA) | 8.00 g |
| Cloruro de potasio (Sigma, Chem, USA) | 0.20 g |
| Fosfato monoácido de sodio (Sigma, Chem, USA) | 2.16 g |
| Fosfato diácido de potasio (Sigma, Chem, USA) | 0.20 g |

El cloruro de magnesio y cloruro de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el pH de 7.2 a 7.5 utilizando HCL 8N (Sigma, Chem,

USA), y se afora a un volumen de final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de membrana (Millipore) con un diámetro 0.22 μm , la solución se almacena a una temperatura de cuatro grados centígrados hasta el momento de su uso.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen TD, Dexter TM, Simmons PJ. (1990). Marrow biology and stem cell. In Dexter TM, Garland JM, Testa NG. (ed.): Colony-stimulating factors: Molecular and cellular biology. Marcel Dekker. New York. pp. 1.
- Aranishi F, Hara K, Osatomi K, Ishihara T. (1997). Cathepsins B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. Physiol. 117:605.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. (1999). Lymphoid development from hematopoietic stem cells. Int. J. Hematol. 69:217.
- Proyecciones de la población de México, 2000-2050. (2002). Base de datos de defunciones INEGI/ Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. CONAPO.
- Batlz MI, Gomer K, Davies AJS, Evans DJ, Klaus GGB, Pepys MB. (1980). Differences in the acute phase responses of serum amyloid P component (SAP) and C3 to injections of casein or bovine serum albumin in amyloid-susceptible and resistant mouse strains. Clin. Exp. Immunol. 39:355.
- Bautista AMA. (1998). Efecto de factores activadores y diferenciadores sobre el granulocito-neutrófilo en banda: diferenciación, fragmentación del ADN y producción de M-CSF. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. (1963). Cytological demonstration of clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature 197:452.
- Begg SK, Beroncello I. (1993). The hematopoietic deficiency in osteopetrotic (OP/OP) mice are not permanent, but progressively correct with age. Exp. Hematol. 21:493.
- Begg SK, Radley JM, Pollard JW, Stanley ER, Crisholm OT, Bertoncello I. (1993). Delayed hematopoietic development in osteopetrotic (OP/OP) mice. J. Exp. Med. 177:237.

- Ben-Hur H, Plonsky E, Gurevich P, Berman V, Tendler Y, Moriel E, Guy M, Sandler B, Rozenberg V, Zusman R, Zusman I. (1999). Morphological and morphometric studies of the splenic antitumor immune response, elicited by liposome-covered soluble p53 kDa antigen, in chemically-induced rat colon cancer. *Int. J. Mol. Med.* 3:545.
- Boyum A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J. Clin. Lab. Invest.* 21:77.
- Clark S, Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony stimulating factors. *Science* 236:1229.
- Coutinho LH, Will A, Radford J, Schiro N, Testa NG, Dexter TM. (1990). Effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factors (csf) human granulocyte-macrophage-CSF and gibbon interleukin 3 on hematopoiesis in human long-term bone marrow culture. *Blood* 75:2118.
- Cronkit EP, Feinendegen LE. (1976). Notions about human stem cells. *Blood Cells* 2:269.
- Chaplin DD, Grayson MH. (2003). Localization of T and B lymphocytes to the white pulp of the spleen is independent of L-, E-, and P-selectin. *Sc. World. J.* 3:484.
- Chaplin DD. (2002). Regulation of spleen white pulp structure and function by lymphotoxin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 512:49.
- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. (1999). *In vivo* proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96:3120.
- Davis WC, Brown WC, Wood P. (1996). Overview of the first International Symposium on Cytokines and Type I Type II Paradigm convened in Cairns, Australia, Oct. 1996. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 63:1.
- Dexter TM. (1989). Haemopoietic growth factors. *Brit. Med. Bulletin* 45:337.
- Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Sehgal PA, Nathan DG, Clark SC. (1986). Stimulation of hematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature* 321:872.

- Dorshkind K. (1990). Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu. Rev. Immunol.* 8:111.
- Eigel WN, Butler JE, Erstrom HM, Farrell VR, Harwalker R, Jenness RM, Whitney R. (1984). Nomenclature of proteins of cows milks. *J. Dairy Sc.* 67:1539.
- Eraklis AJ, Kevy SB, Diamond LK, Gross RE. (1967). Hazard of overwhelming infection after splenectomy in childhood. *N. Engl. J. Med.* 276:1225
- Estadística de egresos hospitalarios de la secretaría de salud, 1999 (2000). *Rev. Salud Pública de México* 42:456.
- Fujii S, Hamada H, Fujimoto K, Shimomura T, Kawakita M. (1999). Activated dendritic cells from bone marrow cells of mice receiving cytokine expressing tumor cells associated with the enhanced survival if mice bearing syngeneic tumors. *Blood* 93:4328.
- Gallin JI, Bujak JS, Patten M, Wolff SM. (1974). Granulocyte function in the Chediak-Higashi syndrome of mice. *Blood* 43:201.
- González MMG. (1996). Técnicas en biología celular. Teoría y Práctica. AGT Editor S.A. México pp. 111-126, 157-199.
- Goodland JR, Macartney JC. (1995). Germinal-center cell proliferation in response to T-independent antigens: a kinetics, morphometric and immunohistochemical study *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 25:918.
- Greenberger JS. (1991). The hematopoietic microenvironment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 11:65.
- Hall C. (1971). *Drying of milk and products*. 2da. Edition. The Avi. Publishing Company Inc. USA. pp. 185.
- Ham WA, Cormack HD. (1985). *Tratado de Histología*. 8va. ed. Ed. Interamericana. pp. 90.
- Hata I, Higashiyama S, Otani H. (1998). Identification of a phosphopeptide in bovine α s-1 casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures. *J. Dairy Res.* 65: 569.
- Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL. (2003). Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* 21:759-806.

- Kondo M, Weissman IL, Akashi K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 28:91:661.
- Lagunes SHE, Ramos MG, Galván QA, Ledesma ME, Weiss SB, Santiago OE. (2001). Efecto del CasNa en la proliferación y viabilidad de células leucémicas y células mononucleadas de médula ósea. *Rev. Biomédica* 12:1.
- Langman J. (1986). *Embriología Médica*. 5ta. ed. Médica Panamericana. pp. 350
- Langevoort HL. (1963). The histophysiology of the antibody response. I. Histogenesis of the plasma cell reaction in rabbit spleen. *Lab. Invest.* 12:106.
- Lipschitz DA, Udupa KB, Milton KY, Thompson CO. (1984). Effect of age on hematopoietic in man. *Blood* 63:502.
- Lotem J, Sachs L. (1985). Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: *in vivo* regulation by compounds that induce inflammation. *Int. J. Cancer* 35:93.
- Magli MC, Iscove NN, Odartchenko N. (1992). Transient nature of early hematopoietic spleen colonies. *Nature* 295:527.
- Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97:3333.
- Mebtus RE, Schadee EIL, Weissman IL. (1998). MaDCAM-I dependent colonization of developing lymph nodes involves a unique subset of CD4+CD8+ hemato lymphid cells. *Cell. Adhesion Comm.* 6:97.
- Morrison SJ, Weissman IL. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 8:661.
- Morrison SJ, Wandycz AM, Akashi K, Globerson A, Weissman IL. (1996). The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2:1011.
- Morrison SJ, Wandycz AM, Herrimati HD, Wrigth DE, Weissman IL. (1997). Identification of a linaje of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124:1929.
- McCulloch EA. (1965). The cellular basis of the genetically determined hematopoietic defect in anemic mice genotype SI/SI. *Blood* 26:399.

- McIntosh GH, Regester GO, Leu LRK, Rogle PJ, Smithers GW. (1995). Dairy protein protect against dimethylhydrazine induced intestinal cancer in rats. *J. Nutr.* 125:89.
- McKenzie SB. (1991). *Hematología Clínica*. Ed. El Manual Moderno. México, pp. 523.
- Medvisky A, Samoylina N, Müller A, Dzierzak E. (1993). An early pre-liver intra-embryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364:64.
- Meisel H. (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 43:119.
- Metcalf D, Robb L, Dunn RA, Mifsud S, Di Rago L. (1996). Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood* 88:3755.
- Metcalf D, Nicola NA. (1995). *The hematopoietic colony-stimulating factors. From biology to clinical applications*. Cambridge. UK. Cambridge University Press pp. 56.
- Metcalf D. (1998). Cell-cell signaling in the regulation of blood cell formation and function. *Immunol. Cell. Biol.* 76:441.
- Metcalf D, Robb L, Donn AR, Mifsud S, Di Rago L. (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood* 88:3755.
- Metcalf D, Burgess AW. (1982). Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. *J. Cell. Physiol.* 111:275.
- Miales JB. (1985). *Hematología Médica de Laboratorio*. Edit. Reverte. España.
- Mora ML, Santiago E, Montesinos JJ, Weiss SB. (1992). Hypothesis: The target cell of GM-CSF is a macrophage precursor capable to produce cells with the property to secrete a G-CSF like activity. *Eur. Cytokine Netw.* 3:337.
- Morrison S, Uchida N, Weissman I. (1985). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:35.
- Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:35.

- Nilsson SK, Bertoncello I. (1994). Age-related with changes in extramedullary hematopoiesis in the spleen of normal and perturbed osteopetrotic (op/op) mice. *Exp. Hematol.* 22:377.
- Nossal GJ, Austin CM, Pie J, Mitchell J. (1966). Antigens in immunity. XII. Antigen trapping in the spleen. *Int. Arch. Allergy* 29:368.
- Noursadeghi M, Bickerstaff MCM, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys MB. (2002). Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J. Immunol.* 169:913.
- Ogawa M, Matsunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Annu. Acad. Sci.* 872:17.
- Osawa M, Hanada K, Hanada H, Nakauchi H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273:242.
- Okano M, Ohnata I, Sasaki R. (1992). Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J. Nutr.* 122:1376.
- Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman I. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristic?. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 30:11842-9.
- Passoti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G. (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Rev. Eur. Med. Farmacol.* 2:71.
- Pendino F, Dudognon C, Delhommeau F, Sahraoui T, Flexor M, Bennaceur-Griselli A, Lanotte M, Segal BE. (2003). Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene* 22:9142.
- Pluznik D, Sachs L. (1965). The cloning of normal mast cells in the tissue culture. *J. Cell. Comp. Physiol.* 66:319.
- Quesenberry P, Levitt L. (1979). Hematopoietic stem cells. *N. Engl. J. Med.* 301:755.

- Ramos MG, Gonzalez RJ, Manrique GB, Weiss SB, Santiago OE. (2001). Transcripción del gene para el M-CSF en la línea celular mieloide 32D tratadas con CasNa. *Rev. Biomédica* 12:1.
- Ramos MG. (1999). Papel del caseinato de sodio en la inducción de la diferenciación de la línea mieloide hematopoyética primitiva 32D. Tesis de Licenciatura. Facultad de estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- Rifkind R, Bank A, Marks PA, Nossel HL. (1976). *Fundamentals of hematology*. Chicago. Yearbook Medical Publishers, pp. 87.
- Romppanen T. (1981). A morphological method for the analyzing germinal center in the chicken spleen. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 89:263.
- Rosnet O, Schiff C, Pebusque ML. (1993). Human FLT 3/FLK 2 gene DNAC cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 82:1110.
- Sachs L. (1996). The control of the hematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:4742.
- Shorro R, Coutinho LH, Testa NG, Dexter TM. (1989). Effect of exogenous growth factors on stromal cells from human LTBM. *Tissue Antigens Histocompatibility and Immunogenetics* 33:229.
- Takeshi K, Wang IM, Tamura T, Ponnamparuma RM, Levine Rachel, Holmes KL, Herbert C, Morse III, De Luca LM, Ozato K. (2003). Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood* 95:3349.
- Tatsuta M, Hshi H, Baba M, Taniguchi H. (1992). Enhanced induction of colon carcinogenesis by azoxymethane in winstar rats fed a low-protein diet. *Int. J. Cancer* 50:108.
- Till JE, McCulloch EA. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14:213.
- Toles J, Chui D, Belbeck L, Starr E, Barker J. (1989). Hemopoietic stem cells in murine embryonic yolk sac and peripheral blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:7456.
- Traver D, Akashi K, Manz M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 15:290.

- Vituri CI, Alvarez Silva M, Trentin AG, Borelli P. (2000). Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33:889.
- Walstra P, Jenners R. (1984). *Dairy chemistry and physics*. John Wiley Sons. N.Y. pp. 106.
- Wong C, Seow H, Liu A, Husband A, Smithers G. (1996). Modulation of immune response by bovine β -casein. *Curr Opin. Cell. Biol.* 74:323.
- Watari S, Asamo S, Shirafuji N, Kodo A, Ozawa K, Takaku F, Kanrachi S. (1989). Serum granulocyte colony-stimulating factors levels in healthy volunteers and patients with various disorders, as estimated by enzyme immunoassay. *Blood* 73:117.
- Weiss L. (1963). The structure of intermediate vascular pathways in the spleen of rabbits. *Am. J. Anat.* 113:51.
- Weiss L. (1964). The white pulp of the spleen. *Johns Hopkins. Med. J.* 115:99.
- Weiss L. (1972). The spleen, in the cells and tissues of the immune system, structure, functions, interactions. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. pp. 49
- Weiss L. (1977). *The blood cells and hematopoietic tissues*. Mc-Graw-Hill, N. Y. pp. 96.
- Weissman IL. (2002). The road ended up at stem cells. *Immunol.* 185:159.
- Williams JW, Beutler E, Erslev AJ, Rundles WR. (1983). *Hematologia*. Salvat Ed. 2da. Edición. Tomo I. España pp. 61.
- Worton RG, McCulloch JE. (1969). Physical separation of hemtopoietic stem cells. *J. Cells Physiol.* 72:221.
- Zambrano RIR, Santiago OE, Weiss SB, Cáceres CR. (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev. Inv. Clin.* 51:53.
- Zsebo K, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA, Karkare SB, Sachdev RK, Yuschenkoff VN, Brirkett NC, Williams LR, Satyagal VN, Tung W, Bosselman RA, Mendíaz EA, Langley KE. (1990). Identification, purification and biological characterization of hematopoietic stem cells factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell* 63:195.