RIC

ARTÍCULO ORIGINAL

El caseinato de sodio induce la diferenciación de las células hematopoyéticas multipotenciales 32D

Gerardo Ramos,* Edelmiro Santiago,* Ignacio Martínez,* Isaac Zambrano,* Beatriz Manrique,* Benny Weiss*

* Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM. México, D.F.

Sodium caseinate induces differentiation of the multipotential hemopoietic cell line 32D

ABSTRACT

Aim. *To determine the role of sodium caseinate (CasNa) in the modulation of hemopoiesis.* ***Materials and methods.*** *32D cells, a murine hemopoietic multipotential cell line dependent on interleukin-3 (IL-3) for proliferation and survival, were used. These cells were cultured with 0.5 ng/mL of IL-3, together with different concentrations of CasNa. We evaluated: proliferation (direct counting under the microscope and use of thymidine ^{3}H), morphological differentiation (giemsa staining), cytochemistry (specific staining for monocytes and granulocytes), and function (presence of Fc receptors and reduction of nitro-blue tetrazolium). In addition, we determined cell viability through trypan blue exclusion and apoptosis using the TUNEL assay in situ.* ***Results.*** *We showed that CasNa induced a decrease in cell proliferation, which is dose dependent, and is neither a result of a diminished cell viability, nor due to an increase in cell death through apoptosis. In addition, CasNa induces cell differentiation towards the monocytic lineage.* ***Conclusions.*** *CasNa has the capacity to differentiate 32D cells towards the monocytic lineage, and, importantly, has a potent differentiating activity on 32D cells being able to promote differentiation in a shorter time than the well known factors G-CSF and GM-CSF.*

Key words. *Sodium caseinate. Myeloid. Hemopoiesis. Differentiation. Monocyte-macrophage.*

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la participación del caseinato de sodio (CasNa) en la modulación de la hematopoyesis. **Material y métodos.** Se emplearon células 32D, una línea celular hematopoyética multipotencial, de origen murino y dependiente de interleucina-3. Estas células se cultivaron con 0.5 ng/mL de interleucina-3 y con concentraciones variables de CasNa. En los cultivos se realizaron estudios de proliferación celular (conteo directo e incorporación de timidina ^{3}H) y de diferenciación morfológica (tinción con Giemsa), citoquímica (tinciones específicas para monocito-macrófagos y para granulocitos) y funcional (presencia de receptores Fc y reducción de nitro azul de tetrazolio), además se determinó la viabilidad con azul de tripano y la apoptosis por la reacción Tunel in situ. **Resultados.** Se demostró que el CasNa produce una reducción en la proliferación, dependiente de la dosis, que ésta no es provocada por una disminución de la viabilidad de las células 32D así como tampoco por un aumento de la muerte celular por apoptosis. Además el CasNa indujo la diferenciación de las células 32D hacia monocito-macrófagos en cultivos de 4 días. **Conclusiones.** Aparentemente el CasNa ejerce una actividad tipo factor estimulador de colonias de macrófagos. Además, parece ser un potente factor de diferenciación de las células 32D, ya que en sólo 4 días de estímulo genera células de tipo monocito-macrófago, a diferencia de los 7 días requeridos por la combinación de G-CSF y GM-CSF.

Palabras clave. Caseinato de sodio. Hematopoyesis. Diferenciación. Monocito-macrófago.

INTRODUCCIÓN

La hematopoyesis es controlada por un grupo de citocinas conocidas como factores de crecimiento hematopoyético e interleucinas,[1,2] sin embargo, existen biomoléculas de origen y naturaleza distinta a las citocinas que afectan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas, como por ejemplo el ácido retinoico, miembro de la familia de las hormonas esteroides.[3,4]

Aunque no existen evidencias directas de la participación de la caseína (la proteína más abundante de la leche) en la hematopoyesis, algunos datos indican que puede activar a los leucocitos ya que la caseína o su sal, el caseinato de sodio (CasNa), inyectada vía intraperitoneal en ratones o peces, inducen una respuesta inflamatoria, promoviendo inicialmente la migración de neutrófilos y posteriormente de macrófagos a la cavidad peritoneal.[5,6] Adicionalmente, se ha reportado un

incremento de la concentración de citocinas tipo factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y de granulocitos (G-CSF), tanto en el suero como en el fluido de la cavidad peritoneal de ratones inyectados con CasNa.[7] Por otro lado, nuestro grupo ha proporcionado evidencias de que la inyección de CasNa a la cavidad peritoneal de ratón, favorece la acumulación de granulocito-neutrófilos y de macrófagos, aunque sólo induce la producción de M-CSF en los granulocitos, un factor que promueve la monocitopoyesis.[8] Este conjunto de datos sugiere que el CasNa tiene la capacidad para inducir la liberación de citocinas.

Además, los cultivos de neutrófilos en banda provenientes de la médula ósea de ratón en presencia de CasNa, presentan una transición acelerada hacia una morfología polimorfonuclear o segmentada,[9] una característica de los granulocito-neutrófilos completamente maduros.[10]

El hecho de que los neutrófilos en banda responden al estímulo con CasNa, a pesar de no estar completamente diferenciados, abre la posibilidad de que otros precursores mieloides más primitivos también sean blanco de esta molécula, lo cual permite considerar la posibilidad de abrir un nuevo campo de estudio *in vitro* e *in vivo* sobre la modulación de la hematopoyesis, donde las proteínas de la leche, un producto alimenticio, pueden tener gran relevancia inmuno-hematológica. Por lo anterior, en el presente trabajo se estudia el efecto del CasNa sobre la proliferación y diferenciación de las células 32D de ratón, una línea hematopoyética multipotencial dependiente de IL-3 y ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis normal.[11]

MATERIAL Y MÉTODOS

Línea celular. La línea mieloide multipotencial 32D dependiente de IL-3,[11] gentilmente donada por la Dra. T. Hoang (Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, Montreal, Quebec, Canadá), se cultivó en una atmósfera al 5% de CO_2 y 37°C, en medio Iscove's Modified Dulbecco's (Gibco BRL USA), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB, Gibco BRL USA) previamente inactivado a 56°C y 0.5 ng/mL de rmIL-3 (R&D System, Minneapolis, MN). El cultivo fue mantenido con una densidad inicial de $1x10^5$ células/mL y resembrado en cajas Petri (Fisher Brand, Denmark) a las 48 horas al llegar a $1x10^6$ células/mL. La concentración de rmIL-3 empleada en este trabajo fue obtenida después de realizar una curva dosis respuesta de la proliferación con las células 32D.

Tratamiento de las células 32D con CasNa. Las células 32D se cultivaron en placas de 96 pozos de fondo plano (Nunclon, Denmark), a una densidad inicial de $2x10_4$ células/mL y 0.5 ng/mL de rmIL-3 y en presencia de 2 mg/mL de CasNa por 1, 2, 3, 4 y 5 días o durante 4 días con 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg/mL de CasNa, a menos que se indique de otra manera. El CasNa (Difco Laboratories, USA) se disolvió en PBS al 10% w/v y se esterilizó por autoclave. En los ensayos se incluyeron como controles, cultivos con PBS a una concentración final del 2%.

Evaluación de la proliferación celular. *Número celular.* Después de transcurrido el tiempo indicado para cada ensayo, los cultivos celulares fueron resuspendidos y una alícuota se colocó en un hemocitómetro para evaluar el número celular bajo un microscopio de luz (Carl Zeiss) y posterior cálculo de la densidad celular.

Incorporación de timidina tritiada. La cuantificación de la incorporación de timidina tritiada fue otro parámetro usado para evaluar la proliferación celular. Al segundo día de cultivo de las células 32D ($2x10^4$ células/mL) en presencia o ausencia de 0.5, 1, 2 y 3 mg/mL de CasNa y 0.5 ng/mL de rmIL-3, se adicionó 1 μ(Ci/mL de ^{3}H-timidina (Amersham, actividad 185 mbq), 24 horas después fueron cosechadas, lavadas con PBS y lisadas con NaOH (0.4 M). Finalmente se añadieron 2 mL de líquido de centelleo (Beckman, USA) y se hizo la lectura en un contador de emisiones beta (Beckman LS6500).[12]

Viabilidad celular. N*ecrosis.* Para determinar la existencia de muerte por necrosis en las células 32D tratadas con CasNa, se empleó el método de incorporación del colorante azul tripano (Sigma Co. USA). Una muestra de las células cultivadas se mezcló en una proporción 1:1 con el colorante, se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente, se colocó en un hemocitómetro y se contaron 200 células para calcular el porcentaje de células muertas (teñidas por el colorante) y vivas.

Apoptosis. Para evaluar la muerte por apoptosis, las células 32D, a una densidad de 1.5×10^5 células/mL, se cultivaron por 48 horas en presencia o ausencia de 0.5 ng/mL de rmIL-3 y 2 mg/mL de CasNa. El botón celular fue lavado con una solución de BSA (albúmina bovina) al 1% en PBS (solución PBA) y fijado con formaldehído al 3%. La apoptosis se evaluó por reacción Tunel in situ,[13] y el porcentaje de células apoptóticas se calculó empleando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BH-2).

Diferenciación Celular: *Diferenciación morfológica.* La diferenciación morfológica se evaluó después de realizar un frotis y teñirlo con el colorante Giemsa (Sigma Co. USA), diferenciando los blastos de los linajes monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo por su tamaño, forma del núcleo y la proporción núcleo-citoplasma.[14,15]

Tinción citoquímica. Para identificar con mayor precisión los linajes celulares, se realizaron técnicas de tinción citoquímica específicas para el linaje monocito-macrófago (alfa-naftil acetato esterasa) y para el granulocito-neutrófilo (cloroacetato esterasa).[16]

Reducción de NBT. La diferenciación funcional se evaluó mediante la reducción del NBT (nitro azul de tretazolio) por los aniones superóxido, que indica la capacidad microbicida de monocitos y neutrófilos, un parámetro usado para evaluar la diferenciación funcional de células fagocíticas.[17] Brevemente, se preparó una solución con 1000 µL de NBT 1.2 mM por cada µL de TPA (miristato ácido de forbol) 324 µM, adicionando suero fetal bovino al 10%. Esta solución se añadió al cultivo en proporción 1:1 agitando suavemente e incubando 30 min. a 37°C. La evaluación de las células que redujeron al NBT se realizó en un microscopio invertido para placas (Sedival).

Presencia de receptores Fc. La expresión de receptores Fc para la IgG se determinó mediante el ensayo de rosetas con eritrocitos activados (EA). Las células fueron lavadas con PBS e incubadas por 30 min. a 37°C con 180 µL de RPMI y 20 µL de eritrocitos de carnero opsonizados con anticuerpos anti-eritrocitos de carnero (Sigma Co. USA). Posteriormente, las células fueron resuspendidas suavemente y se colocaron en un hemocitómetro y se contó el número de rosetas formadas. Células con tres o más eritrocitos adheridos se consideraron positivas.[18]

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y cuando menos tres veces de manera independiente, los resultados se expresaron como media y su desviación estándar. En los ensayos de viabilidad, apoptosis y diferenciación (morfológicos, citoquímicos y funcionales) se contaron al menos 200 células por preparación.

RESULTADOS

Para evaluar el afecto del CasNa en la cinética de proliferación de las células 32D, se emplearon estas células con o sin 2 mg/mL de CasNa, dosis que induce la diferenciación de neutrófilos en banda.[9] En este ensayo se demostró que a pesar de la presencia de la rmIL-3, el CasNa redujo la proliferación celular desde los 2 días de cultivo, aunque fue más evidente a los 3, 4 y 5 días con un decremento de hasta un 50% en comparación con la proliferación obtenida con la adición de sólo rmIL-3 (Figura 1). Los cultivos no mostraron proliferación en ausencia de rmIL-3 con o sin CasNa (datos no mostrados).

Para determinar si la reducción de la proliferación de las células 32D era dosis dependiente, se realizó una curva dosis-respuesta con CasNa. La evaluación del número celular después de 4 días de cultivo mostró que con 0.5 mg/mL de CasNa ya existían indicios de inhibición, sin embargo, se requirió 1 mg/mL o más para obtener un abatimiento en la proliferación de aproximadamente el 50% (Figura 2a).

La reducción de la proliferación inducida por el CasNa, se confirmó mediante ensayos de incorporación de timidina tritiada, usando las dosis (0.5, 1, 2 y 3 mg/mL) de CasNa que mostraron signos de abatimiento de la proliferación celular. Los datos muestran que estas dosis redujeron la proliferación en aproximadamente un 60% (Figura 2b).

Con el propósito de establecer si la reducción en la proliferación provocada por el CasNa es consecuencia de una disminución de la viabilidad celular, las células 32D se cultivaron durante 4 días con diferentes dosis de CasNa. Por medio de la técnica de exclusión de azul tripano, se encontró que la viabilidad celular fue de aproximadamente el 90%, independientemente de la concentración (0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg/mL) de CasNa. También se observó un 90% de viabilidad celular al emplear 2 mg/mL de CasNa durante 1, 2, 3 y 4 días de cultivo.

Al evaluar la apoptosis en las células 32D cultivadas por 2 días con sólo 0.5 ng/mL de rmIL3 o en combinación con 2 mg/mL de CasNa, en ambos casos se encontró un 2 ± 0.5 y 3 ± 0% de muerte por apoptosis respectivamente, a diferencia del 100% encontrado en los cultivos en ausencia de rmIL-3 con o sin CasNa.

Para determinar si la caída de la multiplicación celular promovida por el CasNa, era consecuencia de una inducción a la diferenciación morfológica, la tinción de las células 32D cultivadas durante 4 días en presencia de diferentes dosis de CasNa, mostró que

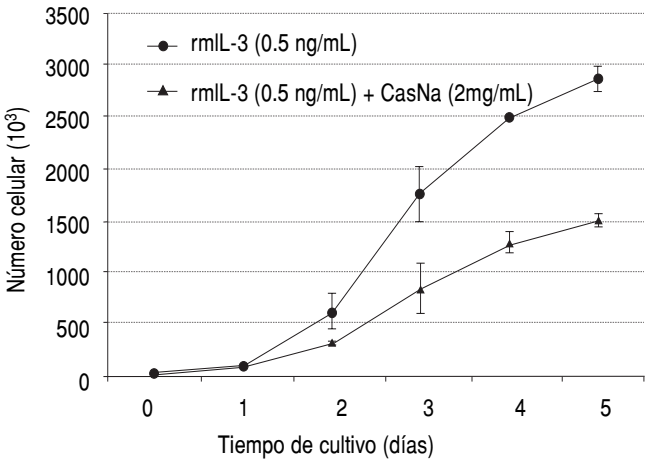

Figura 1. *Proliferación de las células 32D en presencia de 2 mg/mL de CasNa a diferentes tiempos de cultivo. rmIL-3 = interleucina-3 recombinante de ratón. CasNa = caseinato de sodio.*

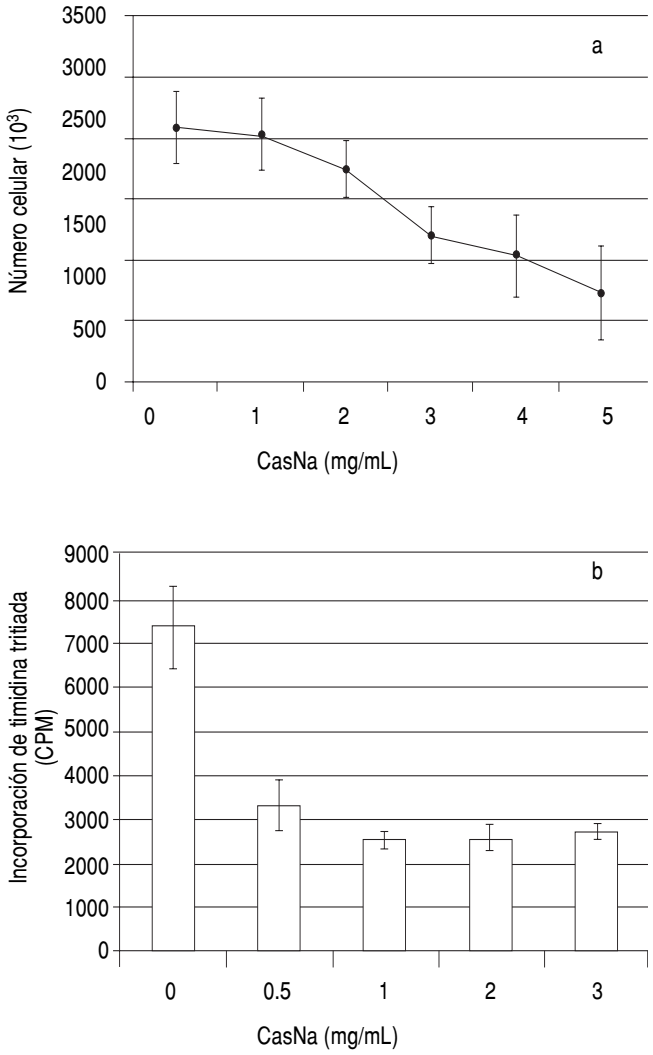

Figura 2. *Proliferación de las células 32D con diferentes dosis de CasNa. a) Evaluación del número celular a los 4 días de cultivo. b) Incorporación de timidina tritiada después de 3 días de cultivo.*

con 1.0 mg/mL ya existen evidencias de diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago, alcanzando un 39 y 49% con dosis de 2 y 3 mg/mL respectivamente, mientras que no se encontraron indicios de diferenciación hacia el linaje granulocítico (Cuadro 1).

Al emplear la técnica de tinción citoquímica específica para monocitos o granulocitos, en las células cultivadas por 4 días con diferentes dosis de CasNa, se encontró que efectivamente sólo se está favoreciendo la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago, mostrando un efecto similar en la evaluación morfológica (Cuadro 1 y Figura 3).

Para estudiar si el caseinato de sodio, además de la diferenciación morfológica y citoquímica, también induce características de diferenciación funcional en las células 32D, se evaluó la producción de radicales de oxígeno (anión superóxido) mediante la reducción del NBT. Los datos indican que las células 32D mostraron una débil pero consistente capacidad para reducir NBT en forma dosis dependiente del CasNa (Cuadro 1).

La cuantificación de otro parámetro de diferenciación funcional, la expresión de receptores Fc, evaluada de acuerdo al porcentaje de la población celular capaz de formar rosetas EA, indicó que el CasNa induce la expresión del receptor Fc en forma dosis dependiente, alcanzando un máximo de 64% de formación de rosetas con una dosis de 3 mg/mL (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Está documentado que las citocinas, hormonas y neuropéptidos modulan la hematopoyesis.[19,20] Los datos presentados en este trabajo dan evidencias de la participación del CasNa, una sal de las proteínas de la leche (caseínas), como otro modulador de la hematopoyesis ya que la adición del mismo disminuyó la proliferación e indujo la diferenciación de las células 32D hacia el linaje monocito-macrófago, así como la expresión de receptores Fc y producción de radicales libres (reducción de NBT). Teniendo en mente que este es el primer estudio que evalúa el efecto del CasNa en la hematopoyesis y el resultado indica bloqueo de la proliferación mieloide, existe la posibilidad de que tal respuesta sea un reflejo del efecto tóxico del CasNa. Sin embargo, este no es el caso ya que encontramos alta viabilidad celular y sin evidencias de muerte por necrosis o apoptosis. Además, la reducción de la proliferación no es consecuencia de la posible presencia de lipopolisácarido un producto bacteriano que puede inhibir la hematopoyesis,[21] ya que la adición de altas dosis no afectó la proliferación de las células 32D (datos no mostrados).

Por el contrario, la disminución de la proliferación, generación de células del linaje monocito-macrófago, inducción a la expresión de receptores Fc y reducción de NBT en las células 32D después de su exposición al CasNa, indica que esta biomolécula promueve una diferenciación mieloide. Particularmente porque la diferenciación de células precursoras hematopoyéticas incluye una reducción de la proliferación y transición de células blásticas hacia formas maduras, acompañada de la producción de lisozima, radicales libres, expresión de receptores de superficie celular tales como los receptores Fc e inmunofagocitosis.[10,22,23]

El CasNa parece ser un potente diferenciador de las células 32D hacia el linaje monocito-macrófago, sobre todo si consideramos que requiere un estímulo de tan sólo 4 días, en comparación de los 7 días de cultivo en presencia de G-CSF más GM-CSF para obtener el mis-

Cuadro 1. Inducción a la diferenciación de las células 32D tratadas con diferentes dosis de CasNa. Porcentaje de monocito-macrófagos y granulocito-neutrófilos después de la tinción con giemsa y citoquímica específica (alfa-naftil acetato esteras para macrófagos y cloroacetato esterasa para neutrófilos). Porcentaje de células reductoras de NBT (nitro azul de tretazolio) y células formadoras de rosetas EA (eritrocitos activados). ND = no determinado.

Caseinato de sodio (CasNa)	Diferenciación morfológica (%)		Tinción citoquímica específica (%)		Expresión de receptores Fc	Producción del anión superóxido
mg/mL	Monocito-macrófago	Granulocito-neutrófilo	Monocito-macrófago	Granulocito-neutrófilo	Formación de rosetas EA (%)	Reducción de NBT (%)
0	0.5 ± 0.7	5.3 ± 1.5	3.8 ± 0.7	11 ± 1.5	10 ± 1.5	0 ± 0
0.1	2.8 ± 2.5	4.7 ± 4.2	N.D.	N.D	14.3 ± 0.6	N.D.
0.5	4.3 ± 1.8	0.7 ± 1.2	11 ± 1.8	5 ± 1.2	23.7 ± 3.3	1.4 ± 1.0
1.0	12.5 ± 4.9	0.3 ± 0.6	29 ± 4.9	6 ± 0.6	46 ± 6.9	2.7 ± 0.1
2.0	39.3 ± 8.8	0 ± 0	35.3 ± 8.8	6 ± 0	54 ± 4.3	4.5 ± 0.4
3.0	48.8 ± 11	0 ± 0	N.D	N.D	64.8 ± 7.0	4.3 ± 0.1

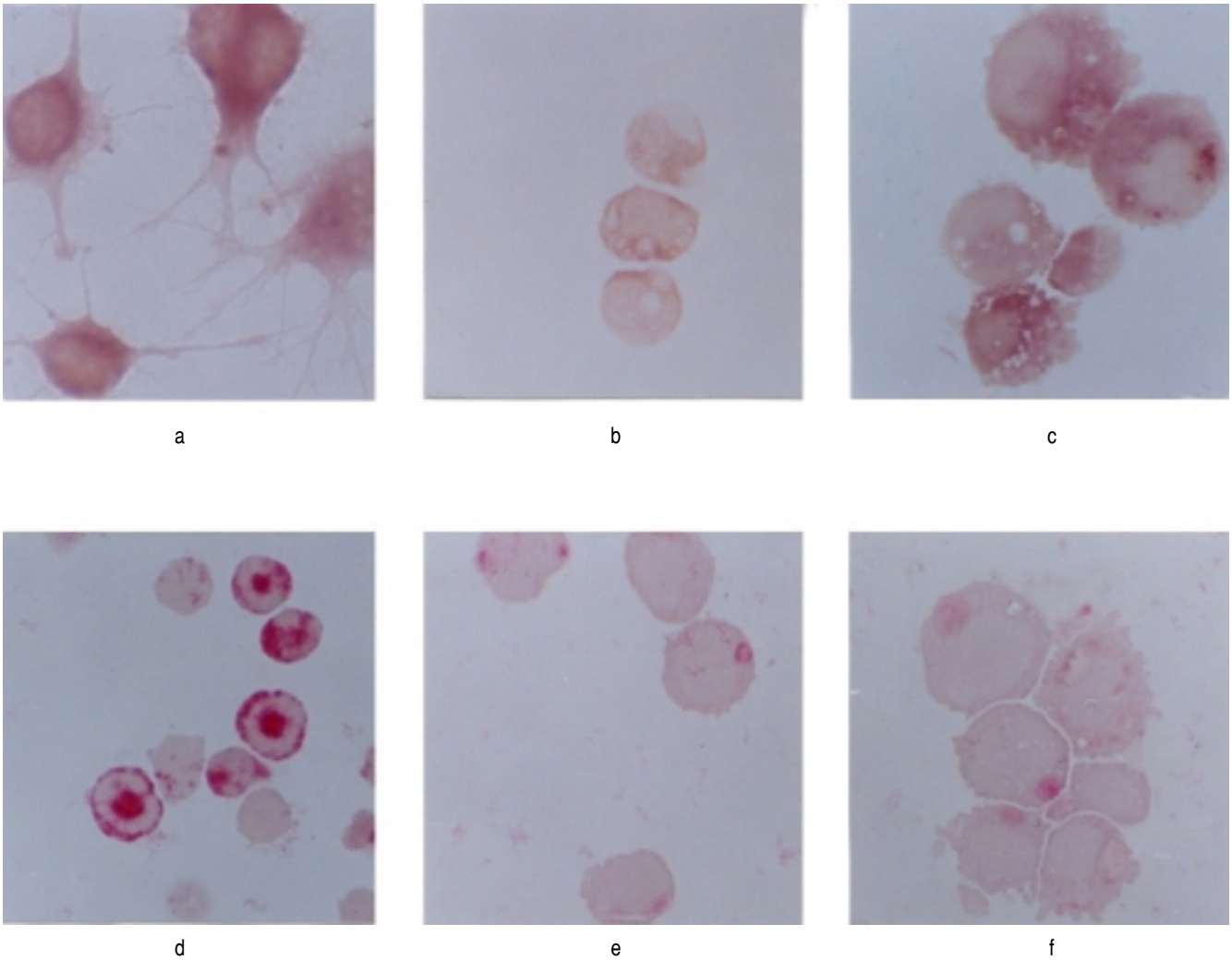

Figura 3. *Tinción citoquímica específica con alfa-naftil acetato esterasa para el linaje monocito-macrófago (a, b, c) y cloroacetato esterasa para granulocito-neutrófilos (d, e, f). Línea macrofágica P388 y células de médula ósea de ratón como control positivo para el linaje macrofágico (a) y granulocito-neutrófilo (d) respectivamente. Células 32D cultivadas con rmIL-3 y suero fetal bovino (b, e). Células 32D cultivadas con rmIL-3, suero fetal bovino y CasNa (c, f).*

mo resultado.[24] La diferenciación de células 32D hacia monocito-macrófagos bajo el efecto del G-CSF y GM-CSF se da gracias a la inducción a la expresión del receptor de GM-CSF promovido por el G-CSF.[24] Desconocemos si el CasNa induce la expresión de alguna citocina y su receptor en las células 32D, de manera que favorezca su diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago. Uno de los candidatos para mediar este efecto es el M-CSF, no sólo porque las células 32D se diferencian hacia monocito-macrófagos, sino porque hemos mostrado que el CasNa induce la producción de M-CSF en los granulocitos.[9] Sin embargo, aunque no se descarta la posibilidad de que las células 32D tratadas con CasNa produzcan M-CSF o su receptor, existen datos que indican que el M-CSF no afecta la proliferación y diferenciación de las células 32D, probablemente por la ausencia de receptores para M-CSF en esta línea celular.[24] Otro candidato es el GM-CSF, sin embargo, debido a que este requiere hasta 7 días de exposición para observar el mismo efecto inducido por el CasNa en tan sólo 4 días de cultivo, es poco probable que este factor sea el responsable de la diferenciación.

Una probable ruta de activación de las células 32D mediada por el CasNa es a través de los receptores opioides. El caseinato de sodio se obtiene disolviendo α-caseína, β-caseína y κ-caseína en hidróxido de sodio y evaporando posteriormente,[25] lo que implica que el CasNa tiene sales de β-caseína. Se ha reportado que la β-caseína y algunos péptidos liberados durante su degradación, conocidos como casomorfinas, favorecen la fagocitosis en células mononucleadas.[26,27] Es ya conocido que las casomorfinas ejercen su actividad biológica uniéndose a los receptores opioides.[28] Además, existen evidencias de la presencia de receptores opioides en células precursoras mieloides.[29] Por lo anterior, la posibilidad de que la ruta de activación del caseinato de sodio sea a través de los receptores opioides parece ser una primera opción a evaluar.

Independientemente de la ruta de activación, es evidente el efecto biológico del CasNa sobre las células mieloides multipotenciales, el cual es similar al de un factor de crecimiento hematopoyético. La propiedad del CasNa para inducir la generación de células del linaje monocito-macrófagos, así como la inducción a la expresión de receptores Fc y producción de radicales libres, semeja la actividad del M-CSF, una citocina específica del linaje monocito-macrófago, la cual promueve un limitado número de divisiones celulares, y fuerte diferenciación hacia el linaje macrofágico.[2]

Las características de diferenciación inducidas en las células 32D por el CasNa son relevantes en el contexto inmunológico. Particularmente porque los monocito-macrófagos son las principales células efectoras del sistema inmune, mientras que los receptores Fc constituyen el puente de comunicación entre la respuesta inmune específica y las células efectoras, vía unión de complejos antígeno-anticuerpo a los receptores Fc. La unión de los complejos inmunes a los receptores Fc desencadena la inmunofagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, producción de radicales libres, e incluso producción de citocinas.[30] Todas estas respuestas se consideran como una de las principales líneas de defensa del organismo ante infecciones por patógenos o en la eliminación de células propias transformadas.[30]

Aunque se ha publicado que la caseína y el caseinato de sodio inducen quimiotaxis en leucocitos *in vivo*,[5,6,31] la β-caseína coestimula la producción de anticuerpos, incremento de la capacidad de los granulocitos para reducir al NBT, inducción[27] o inhibición de la proliferación de linfocitos,[32] además el CasNa induce la liberación *in vivo* de citocinas tipo M-CSF y G-CSF[7] y de M-CSF *in vitro*.[9] Este es el primer trabajo que demuestra que el CasNa induce la diferenciación morfológica y funcional a partir de precursores hematopoyéticos multipotenciales, lo cual resalta la posible importancia biológica de los compuestos de la familia de las caseínas en la respuesta inmune y modulación de la hematopoyesis. Por lo anterior, este estudio realizado *in vitro* sugiere una nueva alternativa en la modulación de la hematopoyesis, a base de proteínas de la leche que puede sumarse a la mediada por citocinas, hormonas y neuropéptidos.

La fuerte capacidad del CasNa para inducir diferenciación mieloide lo hace un candidato propicio para evaluar su efecto en células hematopoyéticas malignas. Así, no sólo conoceremos su papel en los procesos básicos de diferenciación, sino que también puede abrir opciones para investigar un posible uso terapéutico en enfermedades oncológicas e infecciosas.

Por otro lado, se ha demostrado que durante la digestión intestinal de la caseína y del caseinato de sodio, se liberan péptidos biológicamente activos,[28,33] entre ellos las casomorfinas, los cuales llegan al torrente sanguíneo y se unen a los receptores opioides, incluyendo a los expresados en los linfocitos[33,34] Es fundamental demostrar que el caseinato de sodio modula la hematopoyesis vía receptores opioides, ya que de confirmarse podría tener gran impacto en el sector salud, sobre todo porque la población de más escasos recursos sufren de desnutrición y alta frecuencia de enfermedades infecciosas, por lo tanto una dieta básica suplementada con caseinato de sodio (ampliamente usado en la industria alimenticia), contribuiría al suministro de proteína de alto valor nutricional y al mismo tiempo existe la posibilidad de que pudiera promover el fortalecimiento de la respuesta inmune.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos el apoyo recibido del programa de DGAPA No IN213397 y IN215199 y de la FES-Zaragoza. Gerardo Ramos tiene beca de la DGAPA y del CONACYT. Ignacio Martínez tiene el apoyo de fundación UNAM. Se agradece el apoyo técnico del Sr. Ranulfo Pedraza.

REFERENCIAS

1. Sachs L. The control of hematopoiesis and leukemia: From basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4742-9.
2. Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol* 1999; 27: 1113-23.
3. Dawson M, Elstner E, Kizaki M, Chen D, Pakkala S, Kerner B et al. Myeloid differentiation mediated through retinoic acid receptor/retinoic X receptor (RXR) not RXR/RXR pathway. *Blood* 1994; 84: 446-52.
4. Grande A, Manfredini R, Tagliafico E, Balestri R, Pizzanelli M, Papa S et al. All-trans-retinoic acid induces simultaneously granulocytic differentiation and expression of inflammatory cytokines in HL-60 cells. *Exp Hematol* 1995; 23: 117-25.
5. Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo G. The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1993; 2: 71-81.
6. Aranishi F, Hara K, Osatomi K, Ishihara T. Cathepsins B, H and L in peritoneal macrophages and hepatopancreas of carp Cyprius carpio. *Comp Biochem Physiol* 1997; 117: 605-11.
7. Lotem J, Sachs L. Independent regulation of myeloid cell growth and differentiation inducing proteins: in vivo regulation by compounds that induce inflammation. *Int J Cancer* 1985; 35: 93-100.
8. Santiago E, Mora L, Montesinos J, Ventura J, Machuca C, Mendoza J et al. Neutrophils produce M-CSF with activity on mouse bone marrow cells and fibroblasts. *Rev Invest Clin* 1994; *Suplemento* 1: 253.
9. Bautista M. Efecto de factores activadores y diferenciadores sobre el granulocito-neutrófilo en banda: Diferenciación, fragmentación del ADN y producción de M-CSF. Tesis Licenciatura, FES-Zaragoza UNAM 1998.
10. Glasser L, Flederlein R. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 1987; 69: 937-44.
11. Greenberger J, Sakakeeny M, Humphries R, Eaves C, Eckner R. Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythoid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2931-5.
12. Zentella A, Weis FMB, Ralph DA, Lahio M, Massague J. Early responses to TGF-β in cells lacking growth suppressive RB function. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4952-8.
13. Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of surface antigens and apoptosis. *Trends Genet* 1994; 10: 41-2.
14. Johnston RB, Zucker-Franklin D. *The mononuclear phagocyte system. In: Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM,* editors. Atlas of blood cells. 2nd. ed. Italy: Ermes, 1988: 323-352.
15. Marmont AM, Damasio E, Zucker-Franklin D. *Neutrophils In: Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM,* editors. Atlas of blood cells. 2nd. Ed. Italy: Ermes, 1988: 159-188.
16. Li C, Lam K, Yam L. Esterases in human leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1973; 21: 1-12.
17. Breitman T. Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL-60. *Method Enzymol* 1990; 190: 118-30.
18. Bianco CP, Nussenzweig V. A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody complement complexes. I. Separation and characterization. *J Exp Med* 1970; 132: 702-12.
19. Mountford J, Bunce C, Hughes S, Drayson M, Webb D, Brown G et al. Estrone potentiates myeloid cell differentiation: a role for 17 beta-hidroxysteroid dehydrogenase in modulating hemopoiesis. *Exp Hematol* 1999; 27: 451-60.
20. Broome C, Whetton A, Miyan J. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production is mediated by both direct effects on CFU-GM. *Br J Haematol* 2000; 108: 140-50.
21. Ayroldi E, Blasi E, Varesio L, Wiltrout R. Inhibition of proliferation of retrovirus-immortalized macrophages by LPS and IFN-gamma: Possible autocrine down-regulation of cell growth by induction of IL1 and TNF. *Biotherapy* 1992; 4: 267-76.
22. Ruhl S, Pluznik DH. Dissociation of early and late markers of murine myeloid differentiation by interferon-gamma and interleukin-6. *J Cell Physiol* 1993; 155: 130-6.
23. Isoda H, Shinmoto H, Kitamoto D, Matsumara MN. Differentiation of human promyelocytic cell line HL-60 by microbial extracellular glycolipids. *Lipids* 1997; 32: 263-71.
24. Kreider B, Phillips P, Prystowsky M, Shirsat N, Pierce J, Tushinki R et al. 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* 1990; 10: 4846-53.
25. Walstra P, Jenneis R. *Dairy chemistry and physics.* John Wiley Sons, New York, 1984.
26. Berthou J, Migliore-Samour D, Lifchitz A, Delettre J, Floc'h F, Jolles P. Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. *FEBS Letters* 1987; 218: 55-8.
27. Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL. Modulation of immune response by bovine β-casein. *Immunol Cell Biol* 1996; 74: 323-9.
28. Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers* 1997; 43: 119-28.
29. Hagi K, Inaba K, Sakuta H, Muramatsu S. Enhancement of murine bone marrow macrophage differentiation by β-Endorphin. *Blood* 1995; 86: 1316-21.
30. Flores F, Santiago E, Weiss SB. Receptores Fcγ en salud y enfermedad. *Rev Invest Clin* 1998; 50: 529-40.
31. Metcalf D. The molecular control of granulocytes and macrophages. *Ciba Foud Symp* 1997; 204: 40-50.
32. Otani H, Monnai M, Hosono A. Bovine k-caseine as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwwissenschaft* 1992; 47: 512-5.
33. Ledoux N, Mahe S, Duarry M, Bourras M, Benamouzin R, Tome D. Intraluminal immunoreactive caseinomacropeptide after milk protein ingestion in humans. *Nahrung* 1999; 43: 196-200.
34. Elitsur Y, Luk G. Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propia lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 493-7.

Reimpresos:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio
Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Cáncer (L-324), FES-Zaragoza. Batalla 5 de Mayo S/N, esquina Fuerte de Loreto, Ejercito de Oriente, Iztapalapa,
C.P. 09230, México, D.F.
Tel/Fax: 5-773-4108, edelmiro@servidor.unam.mx

Recibido el 03 de enero de 2000.
Aceptado el 28 de junio de 2000.