



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS
RECEPTORES FcγRI y II, CD14, HLA-DR Y
CR3 ASI COMO LA FAGOCITOSIS EN
MONOCITOS HUMANOS AISLADOS A
PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA DURANTE
SU DIFERENCIACIÓN CON VITAMINA D3

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :
LINDA BENITA NÚÑEZ GARCÍA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



MÉXICO, D.F.

2005

m348861



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

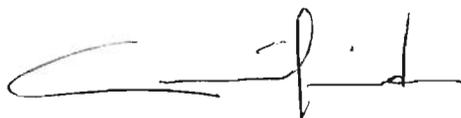
Jurado asignado:

Presidente	Prof. María Magdalena Acosta y Segura
Vocal	Prof. Patricia Elvira Berrón Ruiz
Secretario	Prof. Enrique Ortega Soto
1er. Suplente	Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís
2º. Suplente	Prof. Constantino III R. López Macías

**El tema se desarrollo en el
Departamento de Inmunología del
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Ciudad Universitaria**



Dr. Enrique Ortega Soto
Asesor



Linda Benita Núñez García
Sustentante

Te dedico este trabajo con todo el cariño y amor que siento por ti... gracias mamá... por ser ejemplo de lucha, perseverancia y motivación, aún en los momentos difíciles.

Agradezco a Dios el haberme permitido ser parte de ti porque gracias a ti soy todo lo que soy.... siempre estarás presente.

**“Si subiere a los cielos, allí estás tú;
y si en abismo hiciere mi estrado,
he aquí, allí tú estás.
Si tomare las alas del alba,
y habitare en extremo de la mar
aún allí me guiara tu mano
y me asirá tu diestra”**

Salmos 139.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Ortega por permitirme desarrollar el proyecto de Tesis en su Laboratorio, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

A CONACYT (proyecto 45092) y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA (proyecto IN220705) por los apoyos financieros otorgados para la realización de la Tesis.

A la DGAPA (proyecto IN220705) por la beca otorgada para el soporte de este trabajo.

A la Facultad de Química por ser parte fundamental en mi formación académica.

A la M. Claudia Garay por su apoyo técnico, al Dr. Constantino III R López por su asesoría técnica, y al Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

A mi padre por su paciencia y apoyo en todas mis decisiones; Grecia, Raymundo, Tomás, por su apoyo y sus consejos y a todos mis demás hermanos. A mis padrinos Martina y Armando por su apoyo y motivación otorgada, a Karina y Ariadna.

A Aldo por haberme apoyado y ser el quién me motivó a seguir adelante. Gracias por haber estado ahí, por ser todo lo que fuiste y eres.

Al Dr. Enrique Ortega Soto, por permitirme ser parte de su laboratorio y por ser un apoyo fundamental en mi formación académica, gracias por su paciencia.

A Claudia Garay por su apoyo técnico en la parte experimental de mi trabajo, por sus consejos y apoyo moral.

Dra. Armida Baez y a la Dra. Isabel Soto por sus consejos y apoyo y a Paola por ayudarme a resolver mis dudas.

A todos los compañeros que estuvieron conmigo durante el desarrollo de la tesis, Alejandra, Aurora y Oswaldo que hicieron amena y divertida la estancia en el laboratorio.

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS
RECEPTORES FcγRI y II, CD14, HLA-DR y CR3 ASÍ COMO
LA FAGOCITOSIS EN MONOCITOS HUMANOS AISLADOS
DE SANGRE PERIFÉRICA DURANTE SU
DIFERENCIACIÓN CON VITAMINA D3**

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 LA RESPUESTA INMUNE.....	2
1.1.1 La inmunidad innata.....	2
1.1.2 La inmunidad adaptativa.....	3

Capítulo 2

ANTECEDENTES

2.1 SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR (SFM).....	5
2.2 EL SISTEMA DE MONOCITOS-MACRÓFAGOS.....	6
2.2.1 Origen.....	6
2.2.2 Mecanismos de adhesión y migración de monocitos.....	8
2.2.3 Activación del macrófago.....	10
2.3 RECEPTORES DE SUPERFICIE DE MONOCITOS/MACRÓFAGOS.....	11
2.3.1 Receptores para inmunoglobulina G.....	12
2.3.1.1 Fagocitosis mediada por receptores Fc γ : mecanismos bioquímicos de señalización.....	14
2.3.2 Receptor tipo tres del complemento (CR3, CD11/CD18 ó α m β 2).....	15
2.3.2.1 Fagocitosis mediada por receptores del complemento.....	16
2.3.3 Receptor para lipopolisacárido, CD14.....	16
2.3.4 Antígenos tipo II del complejo principal de histocompatibilidad MHC-II.....	17
2.4 EL MACRÓFAGO COMO CÉLULA EFECTORA.....	17
2.4.1 Fagocitosis.....	17
2.4.2 Expresión de efectores antitumorales y antimicrobianos.....	19
2.4.3 Producción de citocinas y otros mediadores solubles.....	19
2.4.4 Presentación de antígeno y estimulación a células T.....	20
2.5 LA VITAMINA D3 COMO INDUCTOR DE DIFERENCIACIÓN CELULAR EN CÉLULAS MONOCÍTICAS.....	21
2.5.1 Inductores de diferenciación en células monolíticas.....	21
2.5.2 Características químicas y biológicas de la VD3.....	21
2.5.3 Mecanismo de acción.....	22
2.5.4 Modelo celular de diferenciación.....	23

Capítulo 3

3.1 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	24
3.2 HIPÓTESIS.....	25
3.3 OBJETIVOS.....	26
3.3.1 Objetivo general.....	26

3.3.2 Metas.....	26
------------------	----

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS.....	27
4.2 AISLAMIENTO DE MONOCITOS HUMANOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.....	28
4.2.1 Procedimiento realizado en el Banco de Sangre.....	28
4.2.2 Enriquecimiento de las células mononucleares (CMN).....	29
4.2.3 Centrifugación en gradiente de Optiprep.....	30
4.2.4 Aislamiento de monocitos humanos por inmunoseparación magnética.....	30
4.2.5 Conteo celular y viabilidad.....	31
4.3 DIFERENCIACIÓN <i>in vitro</i> DE MONOCITOS HUMANOS AISLADOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA (MSP) Y DE CÉLULAS U-937.....	31
4.3.1 Tratamiento con VD3.....	31
4.3.2 A las 24 horas de tratamiento.....	31
4.3.3 A las 48 horas de tratamiento.....	32
4.3.4 Recolectión de las células y observación morfológica.....	32
4.4 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA E INDIRECTA.....	32
4.4.1 Tinción directa e indirecta.....	32
4.4.2 Fijación de las células teñidas.....	33
4.5 FAGOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES Fc γ EN CÉLULAS U-937 Y MSP EN SUSPENSIÓN.....	33
4.5.1 Almacenamiento de los eritrocitos.....	33
4.5.2 Sensibilización de los eritrocitos con ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS).....	33
4.5.3 Título de hemaglutinación.....	34
4.5.4 Opsonización de eritrocitos sensibilizados.....	35
4.5.5 Fagocitosis.....	35

Capítulo 5

RESULTADOS

5.1 CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR VD3.....	37
5.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES Fc γ RI y Fc γ RII, CR3, CD14 Y HLA-DR A LOS DISTINTOS TIEMPOS DE TRATAMIENTO CON VD3.....	41
5.3 EFECTO DE LA VD3 SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA.....	62

Capítulo 6

DISCUSIÓN.....	68
----------------	----

Capítulo 7

CONCLUSIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74
ANEXO I SOLUCIONES.....	79
ANEXO II ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	82

ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo
CMN	células mononucleares
CL	células leucocitarias
CR3	receptor tipo 3 del complemento
BSA	albúmina sérica bovina
EDTA	etilendiaminotetraacetato disódico
FITC	isotiocianato de fluoresceína
HEPES	ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico
HLA	antígeno humano leucocitario
IL	interleucina
INF	Interferón
LPS	lipopolisacarido
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
MBS	solución amortiguadora para MACS
MSP	monocitos de sangre periférica
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PMN	leucocito polimorfonuclear
PFA	paraformaldehído
PE	ficoeritrina
S. Aut.	suero autólogo inactivado
SFB	suero fetal bovino inactivado
T. a.	temperatura ambiente
TNF	factor de necrosis tumoral
TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico
VD3	1- α ,25-dihidroxi vitamina D3

RESUMEN

Los macrófagos son una de las principales células que participan en la inmunidad, llevan a cabo un complejo proceso de maduración y activación. Diversas moléculas provenientes del microambiente intercelular e intracelular son las implicadas en iniciar este proceso. Una de las funciones efectoras de los monocitos/macrófagos es la fagocitosis; que puede ser iniciada por receptores Fc γ presentes en la membrana de la célula. Los receptores Fc γ se unen a la región Fc de la inmunoglobulina G, una vez que han sido agregados, se activa una cascada bioquímica de señalización que culmina con la internalización de la partícula dentro del fagosoma formado.

Se ha observado que en las líneas celulares mieloides hay un aumento en la expresión de algunos receptores, como CD14 y CR3, así como cambios en la capacidad fagocítica y cambios morfológicos durante su diferenciación con diferentes agentes. En este trabajo estudiamos la capacidad fagocítica mediada por IgG, así como la expresión de los receptores CD14, Fc γ RI, Fc γ RII, CR3 y HLA-DR antes y después de la diferenciación *in vitro* con 1 α ,25-dihidroxitamina D3 en monocitos humanos de sangre periférica.

Demostramos que bajo nuestras condiciones de tratamiento con VD3, los monocitos humanos de sangre periférica sufren cambios morfológicos característicos de un proceso de diferenciación hacia un estadio más maduro, al igual que en las células U937. La diferenciación de monocitos humanos de sangre periférica *in vitro* con VD3 no indujo cambios en la expresión en membrana de los receptores Fc γ RI, Fc γ RII y CR3; pero sí un ligero aumento en la expresión del HLA-DR, y un aumento significativo en la expresión del CD14.

Los cambios observados en las células U-937 durante su diferenciación con VD3 corroboran los reportados; con un gran aumento en la capacidad fagocítica pero relacionado con poco aumento en la expresión de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII. Esto ha sugerido que la diferenciación puede inducir cambios en la activación de las vías bioquímicas de señalización.

También mostramos que en los monocitos humanos de sangre periférica la fagocitosis mediada por IgG, subclase 1 y 2 no tiene cambios significativos durante el proceso de diferenciación con VD3, el cual mostró tener una gran variabilidad entre los distintos donadores.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 LA RESPUESTA INMUNE

Los mecanismos de defensa del organismo humano contra la invasión por microorganismos patógenos se han clasificado en dos tipos: la defensa innata y la defensa adaptativa; la primera actúa en la fase más temprana de las infecciones y la segunda, gracias a su propiedad de memoria, protege contra la reinfección por el mismo microorganismo.

Ambas respuestas dependen de las actividades de los glóbulos blancos o leucocitos. Las células que participan en la inmunidad innata son las células dendríticas, los granulocitos y los fagocitos mononucleares. En la inmunidad adaptativa tienen un papel muy importante los linfocitos, aunque en la fase efectora participan de manera importante granulocitos y macrófagos.

Los mecanismos del sistema inmune innato constituyen una primera línea defensiva contra muchos microorganismos comunes, pero no siempre pueden eliminar el agente infeccioso e incluso hay algunos patógenos que este sistema de defensa es incapaz de reconocer y eliminar. Los linfocitos de la inmunidad adaptativa han desarrollado mecanismos genéticos a través de los cuales pueden generar un repertorio mucho más extenso de receptores de reconocimiento, y además desarrollar una memoria inmunológica para brindar una respuesta más eficiente ante casi cualquier patógeno.^{12,40}

1.1.1 La inmunidad innata

Los mecanismos de defensa que incluye la inmunidad innata son:

(a) Barreras físicas: incluyen la piel y mucosas de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. Además de ser impermeable a los microbios si no ha perdido su integridad, la superficie epitelial produce sustancias químicas que son microbicidas, como defensinas, lisozima, lactoferrina, glucolípidos salivales y lactoperoxidasa, que pueden inhibir el crecimiento microbiano. También forman parte de la inmunidad innata los distintos mecanismos físicos por medio de los cuales el cuerpo provoca la salida de los microorganismos, como la tos, los estornudos, la salivación y el lagrimeo. La descamación de la piel y otras formas de recambio celular en las superficies corporales, remueven un sinnúmero de microorganismos adheridos.^{35,40}

(b) Factores humorales: entre ellos destaca el sistema del complemento, constituido por proteínas plasmáticas, capaces de ser activadas por la vía alterna por determinadas estructuras microbianas. Si el sistema es activado entran en

acción varios componentes del mismo que pueden provocar la lisis de los microorganismos, generándose además fragmentos peptídicos que contribuyen a facilitar la fagocitosis, estimular la quimiotaxis y propiciar la inflamación.

(c) Fagocitosis: llevada a cabo por células especializadas denominadas fagocitos, constituidos por leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos circulantes y macrófagos fijos en los tejidos, que están capacitados para ingerir partículas opsonizadas con anticuerpos o componentes del complemento y además pueden identificar e ingerir muchos microorganismos directamente. Todo esto se da gracias a los receptores en la superficie de su membrana, que reconocen el fragmento Fc de las inmunoglobulinas [receptores Fc, (FcR)], componentes comunes de numerosos patógenos [receptor de lipopolisacárido, LPS (CD14)] y componentes activados del complemento [receptor tipo 3 del complemento, (CR3)]. Cuando un agente microbiano atraviesa la barrera epitelial, se produce inmediatamente una reorganización de fagocitos en el epitelio conectivo, hay migración de PMN y reconocimiento, ingestión y destrucción del patógeno por los macrófagos. Hay secreción de citocinas, procesamiento y presentación de antígenos para inducir la respuesta inmune adaptativa por parte de macrófagos y células dendríticas para la estimulación de los linfocitos T. Al mismo tiempo, la liberación de citocinas determina la forma o el tipo de respuesta adaptativa que se desarrollará.^{35,40}

(d) Respuesta inflamatoria. Las citocinas liberadas por las células dendríticas y los fagocitos, constituyen una diversidad de sustancias mediadoras de inflamación como la IL-1, IL-5, IL-8, IL-12 (interleucinas) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Además, la activación del complemento por los agentes infecciosos contribuye a la inflamación mediante la función de anafilotoxina de los fragmentos C5a y C3a (y en menor cantidad C4a) los cuales activan a los mastocitos que liberan gránulos que contienen sustancias vasoactivas (histamina, serotonina, bradiquina) y pueden estimular al endotelio vascular cercano al sitio de la infección. Los efectos de todos estos mediadores dan como resultado la respuesta inflamatoria.

(e) Interferones (IFN's) y células asesinas naturales (NK). Los primeros interfieren con la replicación viral. El IFN- α e IFN- β , elaborados por células infectadas, ofrecen resistencia a la replicación viral por acción de los genes que destruyen el RNA de doble cadena viral e inducen la expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I). La actividad citotóxica y destructiva de las células NK se incrementa entre 20 y 100 veces por influencia del IFN- α , IFN- β e IL-12.^{1,18}

1.1.2 La inmunidad adaptativa

Las respuestas adaptativas se generan a partir del contacto inicial con el antígeno y alcanzan su máxima potencia después de varios días, tiempo requerido para que las clonas específicas de linfocitos T y B tengan oportunidad de encontrar al antígeno, proliferen, se diferencien y se conviertan en células efectoras.

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla en dos direcciones interrelacionadas estrechamente: respuesta inmune humoral, donde los linfocitos B juegan un papel preponderante, y respuesta inmune celular, en la cual los linfocitos T son las células fundamentales. Ambas respuestas comienzan con la activación de los linfocitos en los órganos linfoides secundarios, proceso en el cual juegan un papel fundamental las células dendríticas, ya sea como transportadoras de antígeno al folículo linfoide como por su función de células presentadoras de antígeno.

Los linfocitos B se unen a proteínas extrañas, polisacáridos o lípidos, a través de su receptor de linfocitos B (BCR) sobre su superficie. Los linfocitos T a través de sus receptores de célula T (TCR) reconocen pequeñas secuencias de péptidos antigénicos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentes en la célula presentadora de antígeno. Los primeros en efectuar este reconocimiento son los linfocitos T CD4. Como resultado del reconocimiento antigénico específico se inicia la fase de activación, durante la cual los linfocitos T proliferan, activan a los linfocitos B, y se diferencian dando origen a células efectoras y de memoria. En la fase efectora los linfocitos T diferenciados a células efectoras migran hacia los sitios de agresión, donde desarrollan sus funciones de secreción de citocinas y de citotoxicidad, contribuyendo de esta manera a la eliminación de los patógenos, mientras que los anticuerpos producidos por los linfocitos B llegan al sitio de la infección por vía sérica.

Las acciones efectoras de los linfocitos T y B promueven la participación de células no linfoides y otros mecanismos de la inmunidad innata, como los anticuerpos opsonizantes que favorecen la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos, anticuerpos activadores de complemento, inmunoglobulinas E que estimulan la degranulación de los mastocitos, y citocinas que estimulan la inmunidad innata.³²

Como podemos ver, los fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos) tienen un papel importante tanto en la respuesta inmune innata ya que son iniciadores de la respuesta inflamatoria; así como en la respuesta inmune adaptativa al ser células presentadoras de antígeno y células que realizan funciones efectoras.

Capítulo 2

GENERALIDADES

2.1 SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR (SMF)

El conjunto formado por los precursores medulares, los monocitos y los macrófagos tisulares, se engloba actualmente bajo la denominación de Sistema Fagocítico Mononuclear (SMF). Estas células cumplen papeles importantes en los mecanismos de defensa innatos y en los mecanismos de la inmunidad adaptativa. Dentro de las funciones de estas células están el reconocimiento y eliminación de microorganismos invasores y células tumorales, la regulación de la proliferación de numerosos tipos celulares tanto del sistema inmune como de otros sistemas, y la secreción de un amplio grupo de sustancias participantes en el proceso inflamatorio.³³

Al igual que todas las células sanguíneas, estas células se originan en la médula ósea a partir de precursores hematopoyéticos (FIG 2.1). Aproximadamente 99% de las células en la médula ósea son precursores reconocibles de las células sanguíneas, granulocitos, monocitos y linfocitos. El 1% son células inmaduras que morfológicamente no se pueden caracterizar y en menor frecuencia se encuentran células madres progenitoras, responsables de toda la producción celular.⁸

Los procesos hematopoyéticos que dan origen a los distintos linajes celulares son: (a) Linfopoyesis, donde un progenitor común de linfocitos (CLP) migra de la médula ósea hacia el timo, posteriormente después de dividirse y disminuir su material celular da origen a linfocitos T maduros CD4 y CD8. (b) Eritropoyesis: a partir del precursor mieloide común bajo la acción del factor estimulador de colonias (SFC) se origina el megacariocito-eritrocito, el que se diferencia a proeritoblasto y a través de divisiones y disminución de material celular se generan los eritrocitos. (c) Granulocitopoyesis, en donde el promielocito bajo la influencia de citocinas y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) madura a mielocito, el estado final de maduración muestra un núcleo lobulado y gránulos, propios de un granulocito (PMNs, eosinófilos). El linaje monocito/macrófago- dendrítico, deriva de un progenitor granulo-monocítico y bajo la influencia del factor estimulador de colonias 1 (CSF-1) se originan los monocitos. Si los monocitos están influenciados por el factor estimulador de colonias granulocito-monocito (GM-CSF) e IL-4 se originan las células dendríticas.⁸ En cuanto al origen de los macrófagos lo veremos con más detalle a continuación.

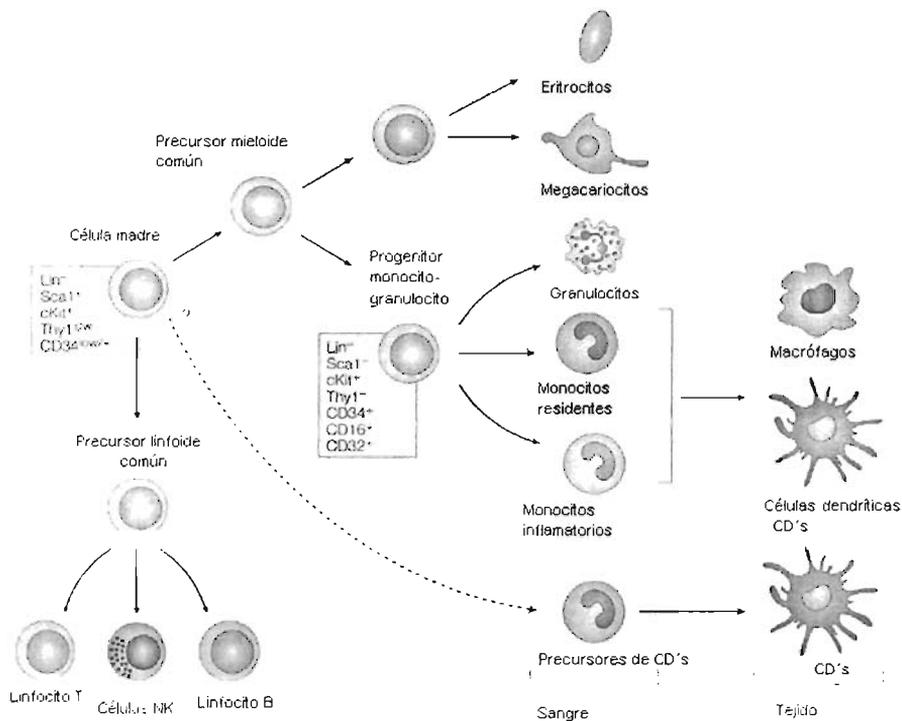


Fig 2.1 Origen y diferenciación hematopoyética de células mieloides. Las células madre en médula ósea se diferencian en células precursoras linfoides o mieloides. Los progenitores granulocito-monocito provienen del precursor mielocítico común. En este estado expresan CD32 y CD16 (Fc γ RII y Fc γ RIII), diferenciándose finalmente a monocitos y granulocitos, que salen de médula ósea a la sangre. Los monocitos después de ser reclutados hacia los tejidos se pueden diferenciar a células dendríticas o macrófagos. (Adaptada de 32)

2.2 EL SISTEMA DE MONOCITOS-MACRÓFAGOS

2.2.1 Origen.

Los macrófagos tienen su origen en las células germinales granulomonocíticas (CGp-GM) de la médula ósea. Por acción del CSF-1, de naturaleza glucoprotéica, la CGp-GM se diferencia hacia célula germinal monopotencial monocítica (CGm-M), la cual se diferencia a monoblasto, y éste; a su vez, a promonocito (en un lapso de 3 a 5 días aproximadamente). El promonocito es la primera célula morfológicamente identificable como precursora de macrófagos,^{8,60} aún no es adherente, prolifera activamente, tiene un tamaño de más de 20 μ m y

tiene un núcleo lobulado provisto con poca cromatina y restos de nucleolo. El citoplasma contiene gránulos que contienen peroxidasa. Por división del promonocito y su posterior diferenciación aparecen los monocitos que abandonan la médula ósea pasando a la sangre.

Los monocitos miden entre 18 y 24 μm de diámetro y tienen forma redondeada, con un núcleo en forma de riñón o herradura, cromatina nuclear laxa y citoplasma muy abundante que forma parte del equipo de organelos necesarios para la síntesis de proteínas secretoras y de membrana, también contienen un arsenal de lisosomas. Jamás presenta granulaciones conspicuas pero sí con frecuencia una pulvurencia azurófila muy fina.²⁴ (Fig 2.2)

A nivel genético varios factores de transcripción son activados, como el factor PU.1, producto del protooncogen Spi-1, un miembro de la familia de protooncogenes que es esencial para el desarrollo del macrófago. Otros factores de transcripción como GATA-1 y GATA-2 controlan la sobrevivencia y/o diferenciación de precursores mieloides.⁶⁰

La progresión del monoblasto hasta macrófago está bajo control de ciertos factores macro y microambientales. Cuando el monocito es requerido, la producción desde los promonocitos hace que la cantidad y actividad de una nucleasa en la médula ósea se incremente de 2 hasta 4 veces en 12 horas. Para esto los promonocitos disminuyen el tiempo requerido para pasar de G1 a G2 y mitosis.⁶² La movilización de promonocitos y el incremento en la producción de monocitos puede resultar en la migración de hasta un 70% del total de la producción en la médula ósea, hacia el sitio de inflamación o daño.⁴¹

Los monocitos representan sólo 1 a 6% de todas las células sanguíneas nucleadas. El proceso de diferenciación y maduración lleva a la inducción de un fenotipo específico de monocito que puede ser modificado por activación.⁴

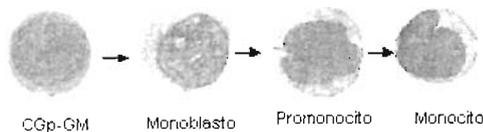


Fig 2.2 Maduración de los monocitos. Se muestran las diferencias de tamaño, reacción tintorial, configuración nuclear y estructura cromatinica en las etapas de maduración de un monocito. *Tinción de Leishman 1x1200.* (Adaptación de 15)

2.2.2 Mecanismos de adhesión y migración de monocitos

Los monocitos circulantes pasan por diapedesis a través del endotelio vascular, donde circulan de 8 a 71 horas antes de emigrar hacia los tejidos en los que se diferenciarán a macrófagos. Los macrófagos pueden presentar diferentes estados funcionales: residentes, inflamatorios y activados. Pueden sobrevivir varias semanas (y quizá meses). Los macrófagos tisulares, recién llegados del torrente sanguíneo, son aún células con gran capacidad de diferenciación, pues todavía no han alcanzado la madurez de algunas de sus capacidades funcionales, debiendo pasar por progresivos estados de activación hasta conseguirlo. Un macrófago tisular sobrevive 2 a 4 meses aproximadamente, y reciben distintos nombres de acuerdo al tejido en el que se encuentren.⁶⁰ (Tabla 2.1).

Recientemente dos tipos de monocitos circulantes han sido identificados en ratón: los que son reclutados al tejido mediante un estímulo inflamatorio y los que arriban independientemente del estímulo inflamatorio. Se ha postulado que el segundo tipo tiene una mayor semejanza con los monocitos humanos.³³ Cada uno de estos tipos de monocitos contribuyen a formar la población de macrófagos y células dendríticas presentes en tejidos, y se ha propuesto que tipos similares se pueden presentar en el humano. En años recientes, se ha empezado a delinear los mecanismos por los cuales está regulado el tráfico de monocitos a los tejidos.³⁴

La adhesión y migración de los monocitos hacia los tejidos durante la reacción inflamatoria está controlada por diferentes quimiocinas. Estas son pequeñas proteínas producidas y secretadas por células endoteliales, leucocitos o células estromales. Las quimiocinas se unen a proteoglicanos en la superficie de las células endoteliales. La interacción de la quimiocina con su receptor induce una rápida activación y señalización a través de diferentes tipos de segundos mensajeros, dependiendo del tipo de quimiocina y del receptor.

Las selectinas presentes en la superficie celular de las células leucocitarias (incluyendo los monocitos/macrófagos) son proteínas que interactúan con ligandos glicoprotéicos de la célula endotelial; la unión es débil, pero permite iniciar la cascada de adhesión. Cuando las células leucocitarias han sido estimuladas por quimiocinas o compuestos quimiotácticos, la adhesión se hace más fuerte debido a que las células endoteliales expresan más receptores para integrinas, presentes en las células leucocitarias.

En ausencia de un estímulo inflamatorio, varias quimiocinas y moléculas de adhesión están involucradas en regular la migración de precursores de macrófagos y células dendríticas a tejidos periféricos. Entre ellas se ha descrito la quimiocina CXCL14 (también conocida como BRAK, quimiocina expresada en riñón), que actúa sobre monocitos circulantes.⁴⁰ Asimismo, se ha propuesto que las integrinas $\beta 2$ de los leucocitos interactúan con ligandos como ICAM1, JAM1 y JAM-C [moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y moléculas de adhesión de las uniones (JAM)], que contribuyen a la migración constitutiva de los monocitos.

En cuanto al reclutamiento de los monocitos durante la inflamación, se ha reportado que hay distintas subpoblaciones de monocitos, definidas en base a

marcadores en su superficie celular, incluyendo receptores para quimiocinas, cuya migración se regula diferencialmente. Los llamados monocitos inflamatorios CD14+ expresan altos niveles del receptor CCR2, el receptor para CCL2 y bajos niveles de CCR5 y niveles intermedios del receptor 1 de quimiocinas CX₃C (CX₃CR1). Los monocitos CD16+, expresan altos niveles del CX₃CR1, CCR5 y CCR3, que son capaces de inducir migración transendotelial. El reclutamiento de los monocitos inflamatorios es dependiente principalmente de la quimiocina CCL2.²¹

Cuando los monocitos son reclutados al sitio de la inflamación, estos actuarán de manera diferente dependiendo si se diferenciarán a macrófagos o células dendríticas. Los monocitos que se han diferenciado a macrófagos llevan a cabo su función fagocítica para después migrar hacia nódulos linfáticos para ser eliminados por apoptosis. En contraste, los monocitos que se han diferenciado a células dendríticas migran rápidamente del tejido dañado hacia los nódulos linfáticos.⁷

Los macrófagos poseen un núcleo arriñonado con uno o dos nucleolos y cromatina nuclear dispersa, el aparato de Golgi esta bien definido y el citoplasma contiene gránulos finos y azurofílicos que son distinguibles por medio de tinciones específicas. El citoplasma es extenso y de contornos no bien definidos, y contiene numerosas vesículas fagosómicas, con desechos generados por la digestión de diversos tipos celulares: eritrocitos, restos nucleares de linfocitos, de PMN y otros no identificables. Las vacuolas citoplasmáticas frecuentemente se observan en la periferia de las células, lo que indica una pinocitosis activa. Una característica morfológica representativa de los macrófagos, es la propensión a adherirse y a extenderse en superficies diversas, dejando los organelos celulares concentrados en la zona central.¹⁵

Las principales funciones de un macrófago son la fagocitosis y la subsecuente degradación de células apoptóticas, microbios y células neoplásicas; la secreción de citocinas, quimiocinas y otros mediadores solubles así como la presentación de antígenos a linfocitos T. Varias de estas funciones son expresadas constitutivamente. Sin embargo, en muchos casos, se requieren señales exógenas para hacer que el macrófago sea competente. Este proceso es comúnmente llamado activación del macrófago.

Organo/tejido	Células	Función
Médula ósea	Monocitos y precursores de monocitos	Control de la hemalopoyesis por secreción de CSF-1, GM-CSF. Fagocitosis de partículas extrañas. Homeostasia del yodo.
S.N.C.	Microglia y Macrófagos del cerebro.	Fagocitosis de partículas. Reparación de heridas.
Higado	Células de Kupffer	Fagocitosis de partículas y endotoxinas. Mediar la respuesta inmunológica en la fase aguda después de algún daño o malignidad por la producción de IL-6.
Pulmón	MΦ alveolares	Sistema Inmune respiratorio y fagocitosis de partículas.
Piel	Células de Langerhans	Presentación de antígenos, keratinización, secreción de prostaglandina E.
Hueso	Osteoclastos	Metabolismo del Calcio y secreción-reabsorción de la hormona paratiroidea.
Linfoide	MΦ del tejido conectivo	Reacción inmune celular, humoral y fagocitosis de partículas
Bazo	MΦ esplénicos	Eritroleucofagocitosis, fagocitosis de partículas, homeostasia del yodo y reacciones inmunes.

Tabla 2.1. Funciones de algunos tipos celulares del linaje monocito/macrófagos (MΦ). (Recopilado de 60)

2.2.3 Activación del macrófago

La población de macrófagos obtenida de un solo tejido es muy heterogénea, y esta heterogeneidad es aún más evidente cuando se comparan poblaciones obtenidas de diversos sitios anatómicos. Esta heterogeneidad es el resultado de linajes funcionales distintos que han sido producto de monocitos estimulados con diferentes moléculas activadoras.

La diferenciación celular, proliferación y activación esta acompañada por cambios en la morfología, actividad enzimática, propiedades biológicas y pérdida o aparición de antígenos en la superficie celular. Estos eventos requieren cambios complejos en la expresión y regulación de genes, y están bajo la influencia de citocinas y hormonas. Un activador soluble prototipo es el IFN- γ , producido por los linfocitos T CD4+ y CD8+, células NK y los mismos macrófagos; este regula la producción de citocinas, e incrementa la expresión del MHC-II y receptores Fc γ . Otro mediador soluble de la activación de macrófagos es el TNF α .³³

Muchos de estos procesos de activación pueden ser antagonizados por citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β . IL-4 e IL-13, pueden tener efectos coestimuladores en el incremento de la producción de ellas mismas. Como estimulador negativo encontramos a la prostaglandina E2, el principal metabolito del ácido araquidónico.⁶⁰

2.3 RECEPTORES DE SUPERFICIE EN MONOCITOS/MACROFAGOS

Las proteínas de membrana funcionan como transportadores, receptores o ligandos que median la interacción con el microambiente y con otras células. Como receptores, detectan los estímulos externos, esa detección la transforman en señales y éstas son transmitidas al interior de la célula. Muchas de las proteínas con actividad de receptor interaccionan físicamente con proteínas del citoesqueleto permitiendo que estímulos externos repercutan en las funciones motrices de las células.

En la respuesta inmune innata juegan un papel importante los receptores tipo Toll (TLRs). Estos son proteínas transmembranales que al ser activadas inducen la activación del factor nuclear NF- κ B y la producción de ciertos péptidos con actividad antimicrobiana. Están involucrados en la respuesta a distintos productos microbianos (por ejemplo LPS, LTA (muramildipeptido), lipopeptido de micoplasma). En algunos casos, los TLRs no se unen a estos productos directamente, sino a través de alguna molécula adaptadora que reconoce directamente al ligando (como CD14).

Los macrófagos expresan receptores para varios componentes del complemento (C3b, C3bi, C4b) depositados en la superficie de bacterias y protozoarios. Estos receptores pueden mediar la internalización de las partículas. La internalización de partículas opsonizadas también puede llevarse a cabo a través de sus receptores Fc γ Rs, los cuales una vez que se han agregado pueden transmitir señales activadoras o inhibitoras hacia el interior del macrófago.

La mayoría de los monocitos son CD14^{+/+} /CD16^{-/-}, los más diferenciados son CD14^{+/+} /CD16^{+/+}. Otros marcadores expresados en distintos tipos de macrófagos son HLA-DR, CD11b (CR3) y CD11c (CR4) (ambos marcadores miembros de la familia de integrinas)³², CD33 (miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas), CD25, CD69, CD36, CD26 y HLA-DP y -DQ.³³ El nivel de expresión de estos marcadores fenotípicos es usado para determinar el curso de la diferenciación del monocito a macrófago.⁶⁷ (Tabla 2.2)

RECEPTOR	LIGANDOS	FUNCIÓN
CD14	LPS, muramildipeptido (LTA), peptidoglicano soluble, proteína W1-1 de la superficie de hongos, células apoptóticas	Reconocimiento y fagocitosis de patógenos y células apoptóticas.
CD36	Colageno tipo I, fosfatidilserina, trombospondina	Deposito de colesterol en lipoproteínas, limpieza de células apoptóticas.
Receptores del complemento		
CR1	C3b, C4b, C3bi	Internalización de microorganismos opsonizados o no opsonizados.
CR3 (Cd11b/CD18)	C3bi, CD54 (ICAM-1); fibrinógeno, oligodesoxinucleótidos.	Interacción de MΦ-Lf T (CR3), inhibición de la producción de IL-12 (CR3)
CR4	C3bi	
Receptores Fc	IgG, partículas cubiertas de IgG	Internalización de microorganismos opsonizados. Inhibición (FcγRIIB) o activación (FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIIA) del MΦ.
Receptor de manosa	Oligosacaridos que contienen manosa y fucosa	Reconocimiento y fagocitosis de patógenos.
NKG2D	Productos del gen RAE-1 y H60	Activación de MΦ para la producción de TNF y NO.
Proteína reguladora de señal α (SIRPα)	CD47 (proteína asociada a integrinas)	Agregación homotípica y activación de MΦ, interacción de macrófagos con Linfocitos T.
Receptores Toll		
TLR2	Oligosacaridos que contienen manosa, fucosa o galactosa	Unión a productos microbianos, activación de macrófagos.
TLR4,5, 6 y 9	LPS, flagelina, lipopeptido de micoplasma, y oligonucleotido bacterianos respectivamente.	
Receptor de vitronectina (α _v β ₃)	Vitronectina, laminina, fibronectina.	Estimulación de la polimerización de actina.

Tabla 2.2. Principales receptores de macrófagos (MΦ's), sus ligandos y funciones. (Adaptado de 63,62)

2.3.1 Receptores para Inmunoglobulina G

Los receptores de la porción Fc de las inmunoglobulinas (FcR's) se expresan en la membrana celular de las células leucocitarias y median un vasto número de respuestas celulares importantes para la defensa del hospedero.⁷

Dentro de estos receptores, los que se encuentran en los monocitos/macrófagos son: FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcαRI y FcεRI, este último sólo en monocitos. Todos los FcRs son capaces de mediar fagocitosis. Ya que la IgG es el anticuerpo sérico más abundante, en este estudio nos enfocamos al estudio de los receptores para IgG.

Hay tres tipos de receptores para la inmunoglobulina G (FcγR) descritos: FcγRI, FcγRII y FcγRIII, cada clase incluye diversas isoformas. Presentan una porción extracelular altamente conservada, pero su tallo citoplasmático es heterogéneo.² El FcγRI (CD64) de 72 kDa, es un receptor de alta afinidad, presenta un dominio extracelular con tres dominios de tipo inmunoglobulina, una porción transmembranal, un tallo citoplasmático y un dímero de cadenas gamma asociado que contiene motivos ITAM (motivo de activación basado en tirosina) similar al que se encuentran en los receptores de células B y T.¹⁹ El FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) son receptores de baja afinidad que se unen a complejos inmunes, tienen dos dominios de tipo inmunoglobulina en su porción extracelular, una porción transmembranal y un tallo citoplasmático. En el FcγRIIA hay un motivo ITAM que se encuentra localizado dentro del dominio citosólico; en el receptor FcγRIIIA también hay un dímero de las cadenas gamma asociado que contiene motivos ITAM. Pero no todos los FcγRs tienen motivos de activación, entre ellos el FcγRIIIB, que se encuentra anclado a la membrana celular por glicofosfatidilinositol, y el FcγRIIB que es un receptor de tipo inhibitorio que no contiene los motivos ITAM. El primero tiene un peso molecular de 40 kDa, el segundo tiene un peso de 50 a 80 kDa.¹⁴ (Tabla 3) La especificidad de su ligando para las diferentes subclases de IgG para el FcγRI es 1,3>>4>>2, para el FcγRII y FcγRIII es 1,3>>>2,4.³⁹

CD	Genes	Isoformas	Afinidad por la IgG (Ka)	Modulación	Función	
FcγRI	64	1q21-23 (IA,IB,IC)	la1	Alta ($10^{8-9}M^{-1}$)	Regulador Negativo: G-CSF, IFNγ, IL-10. Regulador positivo: IL-4, IL-3	Internalización y presentación del antígeno, generación de iones superóxido, ADCC, fagocitosis y producción de citocinas
FcγRII	32	1q23-24 (IIA, IIB, IIC)	Ila, sIIa2, IIb1y IIb2 (sólo en macrófagos), IIc (sólo en células NK)	Baja (10^7M^{-1})	Regulador Negativo: IL-4	Ila: Internalización, ADCC, fagocitosis, producción de citocinas y estallido respiratorio. IIb2: Internalización IIb1/IIb2: Regulador negativo de células B, macrófagos y células cebadas.
FcγRIII	16	1q23-24 (IIIA, IIIB)	IIIa, IIIb (sólo PMN)	Medja ($3 \times 10^7M^{-1}$) Baja (10^7M^{-1})	Regulador Negativo: IL-4 Regulador positivo: TGFβ	IIIa: fagocitosis, ADCC, generación del ión superóxido, producción de citocinas, inducción de la adhesión y apoptosis.

Tabla 2.3. Función y características de los FcγR presentes en monocitos y macrófagos. (Adaptado de 14 y 61)

Entre las respuestas mediadas por los FcγR se incluyen la fagocitosis, citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), incremento en el metabolismo del araquidonato, liberación de histamina y otros mediadores inflamatorios, producción y secreción de linfocinas, generación de especies reactivas de oxígeno, modulación de la diferenciación y proliferación celular, etc.

Los receptores activadores señalizan a través de los motivos ITAM, que son secuencias que cumplen el consenso Y-xx-LX₅₋₁₂-YX₂₋₃L/I.^{46,49} Estos dominios están localizados dentro del dominio citosólico del receptor FcγRIIA, o dentro de la cadena γ del FcγRI y FcγRIIA. Se requiere la asociación de la subunidad γ del FcγRI y FcγRIIA⁴⁸, así como fosforilación de la tirosina en el ITAM para que se de la transducción de señales bioquímicas durante la activación celular. (Fig 2.3)

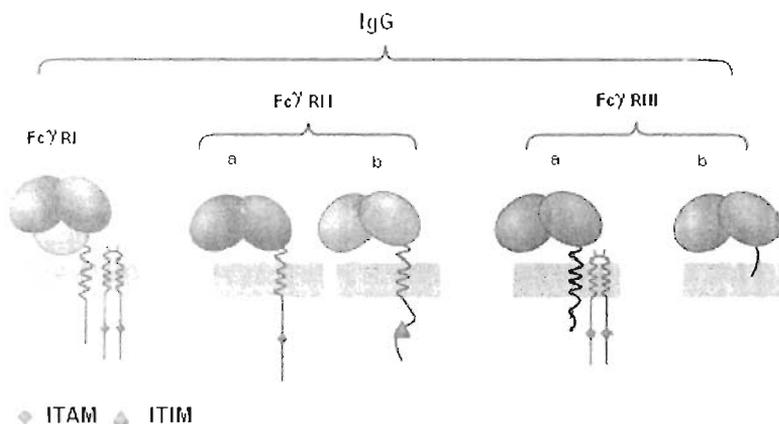


Fig 2.3. Estructura de los receptores para IgG. Las tirosinas del ITAM contenidas en el tallo citoplasmático están indicadas en rombos rojos, los ITIM en triángulos verdes. Se representan dos ó tres dominios de unión al ligando en óvalos. Todos tienen un dominio un transmembranal y un tallo citoplasmático con excepción del FcγRIIIb el cual está unido a la membrana por glicofosfatidilinositol.

2.3.1.1 Fagocitosis mediada por los receptores Fcγ: mecanismos bioquímicos de señalización

Las primeras enzimas intracelulares en ser activadas después de la agregación de los receptores Fc, son miembros de la familia Src de cinasas de residuos de tirosina, como Hck y Lyn. Esta activación resulta en la fosforilación de las tirosinas del ITAM, que sirve como un sitio de unión de alta afinidad para Syk, un miembro de la familia de cinasas de residuos de tirosina Syk ZAP/70 que contienen dos dominios SH2.¹³ Syk cataliza la fosforilación de diversos sustratos, incluyendo otros ITAM's de los FcγR's, así como efectores de señalización como fosfolipasa C (PLC)γ1, la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3-K), la cual genera PI-3,4,5-trifosfato [PI(3,4,5)P₃].^{51, 61} También se activan la fosfatasa de inositol 1 (SHIP-1) y la cinasa activada por mitógenos (MAPK).^{3,50}

Rac o Cdc42 también son activadas después de la agregación de los FcγR's a través de la activación de un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF). Posiblemente Syk, participa durante el ensamblaje de actina.

Diversas fosfolipasas son esenciales, como la ya mencionada fosfolipasa C (PLC), que hidroliza el PI(4,5)P₂ a DAG (diacilglicerol) e IP3 (inositol trifosfato), el cual puede activar a PKC (proteína cinasa C) e incrementar los niveles de calcio citosólico, respectivamente. También se encuentran la PLD, PI-3K y PI4P5PK.⁵⁷

ARF6 es una GTPasa pequeña que modula el ensamblaje de actina. Se sugiere que se requiere para la activación de la PLD, que está asociada a la membrana plasmática y cataliza la producción de ácido fosfatídico (PA) requerido para la fagocitosis.⁵¹ El PA activa la fosfatidil inositol 4-fosfato 5-cinasa tipo I [PI(4)P5K] para producir fosfatidil inositol 4,5 bifosfato [PI(4,5)P₂], implicado en la polimerización de actina durante la fagocitosis.²⁹ Las isoformas Clase IA y IB de la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI-3K) son activadas después de la agregación de los FcγR's y parecen participar en la exocitosis y la emisión de pseudópodos, así como contribuir en el remodelamiento de la membrana.

La señalización bioquímica resultante de la agregación de los FcγR's no sólo depende de la isoforma o del tipo celular; sino que es altamente dependiente del estado de diferenciación de la célula.^{52, 61} Se propone que estos estados están coordinados por la difusión lateral de moléculas en la membrana de el "señalósoma" formado.⁵⁷

La regulación negativa de la fagocitosis en los monocitos/macrófagos puede ser mediada por el FcγRIIb, el cual contiene un motivo de inhibición basado en tirosina (ITIM), el cual una vez fosforilado recluta SHIP, la cual cataliza la defosforilación del fosfatidil inositol 4,5,5 trifosfato (PI(4,5,5)P₃), disminuyendo la intensidad de la señal, de esta manera regula negativamente la fagocitosis.³

2.3.2 Receptor tipo tres del complemento (CR3, CD11/CD18 o α_mβ₂)

Las proteínas del complemento están presentes en el plasma. Cuando se activa la cascada del complemento, los fragmentos resultantes de la proteólisis de algunos de los componentes, se unen a la superficie de las bacterias, opsonizándolas para ser fagocitadas por receptores presentes en la membrana celular de los macrófagos, como el CR1, CR3 y CR4.¹⁷

El CR3 es un miembro heterodimérico de la familia de integrinas β₂, requiere la presencia del CD18 (cadena β₂ de las integrinas) para su expresión en la membrana celular (α_mβ₂, CD11b/CD18). Se expresa en la membrana plasmática de leucocitos PMN, fagocitos mononucleares y células NK.⁹ Los monocitos expresan altos niveles de CR3 y se conoce que se produce un incremento en su expresión durante la maduración de monocito a macrófago.

El CR3 puede interactuar directamente con moléculas de la superficie de ciertas bacterias y parásitos (por ejemplo filamentos de hemaglutinina de *Bordetella pertusis*, la proteína de 63 kDa de *Leishmania sp.*, *Histoplasma capsulatum*, etc.).² Se une específicamente a C3bi y es el responsable de la internalización de partículas opsonizadas con complemento.¹⁹ Su expresión es inducida por activadores de PKC como el miristato de forbol-acetato (PMA), TNF-α

y GM-CSF.¹⁷ Puede interactuar con los FcγR's para sinergizar la lisis extracelular y fagocitosis de blancos cubiertos con IgG y C3.⁴⁸

2.3.2.1 Fagocitosis mediada por receptores de complemento.

La fagocitosis mediada por CR3 ocurre de manera relativamente pasiva, la partícula opsonizada por el complemento provoca un hundimiento dentro de la célula con pseudopodia, en este punto, en la región separada de la membrana hay un enriquecimiento de una variedad de proteínas del citoesqueleto, incluyendo F-actina, vinculina, α -actinina, paxilina, y proteínas que contienen fosfotirosina.^{13, 2} El CR3 como mediador de la internalización, requiere que los microtubulos estén intactos y se acompaña de la acumulación de vesículas para la formación del fagosoma, sugiriendo que el tráfico en la membrana tiene un papel importante en la fagocitosis mediada por receptores del complemento. La diferencia entre la fagocitosis mediada por receptores para IgG y por receptores del complemento es que en la primera se induce la producción y secreción de moléculas proinflamatorias como las especies reactivas de oxígeno y metabolitos del ácido araquidónico; en la segunda no hay un incremento de producción de esta clase de mediadores inflamatorios.⁶⁶

2.3.3 Receptor para lipopolisacárido, CD14

La molécula de CD14 es uno de los antígenos más específicos y es predominantemente expresado en la membrana de monocitos maduros, macrófagos, y algunos granulocitos.⁶⁷ No se expresa en progenitores mieloides. Está anclado a la membrana por fosfatidilinositol. Su gen se encuentra en el cromosoma 5, que contiene genes que codifican para diversos factores y receptores de crecimiento.²⁵ Tiene un peso molecular de 53 a 55 KDa, se han descrito dos formas solubles, una de las cuales se puede unir al ácido lipotético y a fosfatidil inositol.³⁰ La relevancia biológica de esta forma es desconocida.⁴³ La segunda forma soluble se encuentra en el citoplasma a una concentración de 2-6 μ g/mL y unida al LPS puede activar a células endoteliales y epiteliales.⁵

Actúa como una molécula de adhesión en células monocíticas endoteliales durante la inflamación, también como receptor de lipopolisacárido (LPS) de la pared de bacterias Gram negativas. El LPS se une a proteínas del plasma, lo cual facilita su unión al CD14, cuando el LPS se une al CD14 y el TLR4 expresado en monocitos y la proteína accesoria MD-2²⁵, la célula comienza activarse e incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias, de mediadores de bajo peso molecular, y de citocinas anti-inflamatorias⁵³. Es regulador positivo de la expresión de algunas moléculas de superficie, incluyendo moléculas de adhesión.

En monocitos humanos de sangre periférica su expresión se mantiene alta y estable durante su diferenciación a macrófagos con IL-4⁶³ y con VD3.⁶ Estudios *in vitro* han demostrado que complejos de sCD14-LPS pueden estimular células que no lo expresan en su membrana.⁵⁰

2.3.4 Antígenos tipo II del complejo principal de histocompatibilidad, MHC-II

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es una región genética altamente polimórfica, que contiene los genes que codifican para la síntesis de proteínas especializadas en el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T. El MHC se encuentra localizado en el cromosoma 6 humano, está dividido en tres regiones: I, II y III. Los dos tipos de genes polimórficos del MHC, los de clase I y II, codifican dos grupos de proteínas estructuralmente diferentes pero homólogas. Las moléculas de clase I se expresan prácticamente en todas las células nucleadas, mientras que las de clase II normalmente sólo se expresan en células dendríticas, linfocitos B, macrófagos y algunos otros tipos celulares. En humanos, el MHC también es conocido como HLA (antígeno humano leucocitario), el HLA clase II (HLA-D) tiene subtipos de antígenos, el HLA-DR, -DP, -DQ y DM.⁴⁴ En monocitos humanos tratados con VD3 se reduce la expresión de antígenos MHC-II.⁶

Las moléculas de clase II están compuestas por dos cadenas polipeptídicas codificadas por el MHC (una cadena α de unos 33 kD y otra β de unos 30 kD). Cada molécula presenta una hendidura extracelular en la cual se une el péptido antigénico, formada por los dos dominios amino terminal de las cadenas α y β . En cada una de estas cadenas, estos dominios están seguidos de un dominio de tipo inmunoglobulina, y están ancladas a la membrana celular mediante dominios transmembranales y citoplasmáticos. Cada molécula tiene dos regiones diferenciadas, una polimórfica diferente en cada molécula (dominio amino terminal) y la región monomórfica (dominios tipo inmunoglobulina) que no presenta péptidos, pero tiene el sitio que sirve de anclaje al correceptor CD4 en moléculas de clase II pudiendo activar a los linfocitos T cooperadores. El IFN- γ es el principal inductor de moléculas de clase II en macrófagos y monocitos.

Como ya se indicó, la función de la molécula de clase II es presentar antígenos a los linfocitos T; esto tiene trascendencia en dos momentos: a) durante la selección del repertorio T en el timo se presentan péptidos de antígenos propios, y b) con los linfocitos T ya maduros, se presentan antígenos no propios para activar la respuesta inmune.

2.4 EL MACRÓFAGO COMO CÉLULA EFECTORA

2.4.1 Fagocitosis

La fagocitosis es iniciada por la interacción de los receptores presentes en la superficie del fagocito con su respectivo ligando en la superficie de la célula o partícula blanco. Los ligandos pueden ser componentes endógenos de la partícula, como el LPS de algunas bacterias y la fosfatidilserina de células apoptóticas.¹⁶ Este tipo de fagocitosis es conocida como no opsonizante. La

opsonización ocurre cuando componentes del complemento, anticuerpos (fundamentalmente IgG) o algunas otras proteínas del suero, se unen a la superficie de una partícula y favorecen la unión de la partícula a la célula, por haber en la célula receptores para estas moléculas. La opsonización facilita el proceso de endocitosis. Este tipo de fagocitosis se denomina opsonizante.⁶²

En la fagocitosis se internalizan partículas de diámetro $>0.5\mu\text{m}$. El proceso ocurre por un mecanismo dependiente de actina¹⁶ y usualmente independientemente de clatrina. Los leucocitos PMN (neutrófilos) y los monocitos/macrófagos desempeñan la función fagocítica de manera profesional. En estas células la fagocitosis ocurre a través de etapas secuenciales comunes. La agregación del receptor lleva a la internalización de la partícula dentro del fagosoma por una secuencia de eventos complejos que requieren activación de cinasas, alteración del metabolismo de fosfolípidos, remodelamiento del citoesqueleto y aceleración del tráfico membranal, como se detalla en los siguientes párrafos.

El primer evento es la quimiotaxis, en el cual las células fagocíticas son atraídas al sitio de lesión mediante estímulos quimiotácticos que se generan durante una infección y/o trauma crónico, como productos o intermediarios del metabolismo bacteriano así como productos que resultan de la activación del complemento (C5a, fragmentos de C3 hidrolizados por proteasa y plasmina, complejo C5,6,7). Las células salen de los vasos sanguíneos, mediante un proceso que sigue varias etapas: un mayor arribo de los leucocitos, rodamiento por el endotelio y más tarde su marginación y adhesión. Después de adherirse al endotelio, los leucocitos se extienden sobre el endotelio vascular y salen por diapedesis a través de las uniones entre las células endoteliales. La interacción entre los factores quimiotácticos y sus receptores sobre las células fagocíticas no solo inicia la migración dirigida de las células, sino que también induce la liberación de enzimas y de metabolitos de oxígeno. La interacción entre los receptores membranales celulares y sus ligandos induce un proceso de señalización a través de proteínas G. En respuesta a los quimioatrayentes, los polifosfoinosítidos membranales se degradan hasta diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato, un potente movilizador de Ca^{2+} . El DAG activa algunas de las isoformas de proteína-quinasa C (PKC) dependientes de la calmodulina. La PKC activada puede fosforilar a sus sustratos, como MARKS (proteína miristoilada en alanina), la cual se libera en la membrana. El MARKS citosólico fosforilado permanece asociado a filamentos de actina y calmodulina, pero ya no los entrelaza, dando como resultado la desestabilización local del esqueleto de actina.

Hay elongación de la membrana plasmática alrededor del material extracelular, formando una vacuola fagocítica, la cual va siendo endocitada hasta formar el fagosoma. El fagosoma y los lisosomas de la célula fagocítica se fusionan. La maduración del fagosoma para convertirse en fagolisosoma causa la degradación de la partícula fagocitada, resultado de la acidificación del fagolisosoma, y de la formación y actividad de metabolitos reactivos de oxígeno y de nitrógeno, causado por la degranulación lisosomal con liberación de enzimas y otros componentes dentro de la vacuola.²² Entre ellos tenemos los gránulos primarios o azurófilos y los gránulos secundarios o específicos. Los gránulos azurófilos primarios contienen proteasas neutras (elastasa, catepsina G),

microbicidas (mieloperoxidasa, lactoferrina), así como hidrolasas ácidas (catepsina B, D y fosfolipasa A₂). Los granulos secundarios o específicos contienen proteasa neutras (colagenasa, activador del complemento), microbicidas (lisozima, lactoferrina), hidrolasas ácidas (fosfolipasa A₂).⁴⁷ Finalmente todos estos cambios culminan en la expulsión del material de desecho mediante exocitosis.

También hay cambios oxidativos relacionados con la función microbicida como cambios en el potencial eléctrico de la membrana, producción y liberación de AMPc, liberación del anión superóxido y más tarde escape de algunas enzimas lisosomales. Hay también un marcado incremento en la actividad del ciclo de las pentosas o hexosas monofosfato y producción de peróxido de hidrógeno, que tienen como consecuencia el aumento en el consumo de oxígeno y glucosa. El efecto tóxico de los metabolitos de oxígeno se neutraliza por la superóxido dismutasa (SOD) tisular y celular, por la catalasa y por algunos otros mecanismos presentes en los PMN y en los monocitos/macrófagos.

2.4.2 Expresión de efectores antitumorales y antimicrobianos.

Como complejos enzimáticos responsables de la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, en el primer caso encontramos a la NADPH oxidasa, complejo proteico que convierte oxígeno molecular en aniones superóxido altamente reactivo (O₂⁻), que reaccionan con una molécula de agua para formar H₂O₂. Los intermediarios de especies reactivas de nitrógeno (NO's) se generan a partir de la arginina y oxígeno molecular por la sintetasa de óxido nítrico (iNOS) inducible.

También contribuyen a la acción microbicida y antitumoral dentro del fagolisosoma la reducción del triptofano (por indoleamina-2,3-dioxigenasa), reducción del yodo (por lactoferrina o regulación del receptor de transferrina) y la acidificación del fagolisosoma.

2.4.3 Producción de citocinas y otros mediadores solubles

Las variadas citocinas que pueden secretar los fagocitos mononucleares pueden ser clasificadas en 4 grupos:

- a) citocinas que median la respuesta inflamatoria: IL-1, TNF, quimiocinas CC (que tienen 2 cisteínas adyacentes) y CXCC (quimiocinas que tienen 2 cisteínas separadas por un aminoácido), como IL-8 y la proteína quimiotáctica de macrófagos-1 (MCP-1).
- b) citocinas que median la activación de linfocitos T y células NK, como IL-1, IL-12 e IL-18.
- c) citocinas que ejercen un efecto sobre los mismos fagocitos mononucleares, como IL-1, TNF, IL-12, IL-18, INF α/β e INF γ .
- d) citocinas que ayudan a terminar el proceso inflamatorio, reguladores negativos, como la IL-10, TGF β .

2.4.4 Presentación de antígeno y estimulación a células T.

Los macrófagos cumplen los requerimientos como células presentadoras de antígeno (APC). Ellos endocitan eficientemente y fagocitan antígenos particulados y solubles, y están equipados con una maquinaria proteolítica consistente en proteasomas no lisosomales y proteasas lisosomales.

2.5 LA VITAMINA D3 COMO INDUCTOR DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MONOCÍTICAS

2.5.1 Inductores de diferenciación celular en células monocíticas

Existen diversos tipos de inductores que inducen a las células monocíticas entrar en un proceso de diferenciación. Bajo la acción de estos agentes, pueden producirse poblaciones celulares diferentes entre sí. Entre los agentes que se ha reportado como capaces de inducir diferenciación en este linaje celular están: ésteres de forbol (como el miristato de forbol acetato, PMA), el IFN- γ ⁵⁹, la VD3, el ácido retinoico, el dimetil sulfóxido (DMSO) entre otros.⁵⁸

La vitamina D3 y el metabolito activo de la vitamina A, el ácido retinoico (RA), están involucrados en el control del crecimiento y diferenciación de diversos tipos celulares. Ambas se unen a uno y tres receptores nucleares respectivamente, los cuales son miembros de la superfamilia de receptores hormonales.⁴⁶ En el presente trabajo se utilizó la vitamina D3 como agente inductor de diferenciación celular.

2.5.2 Características químicas y biológicas de la VD3

La 1 α ,25-dihidroxitamina D3 es una hormona esteroide³¹ (Fig. 2.4). Esta vitamina se forma por irradiación solar a partir del 7-deshidrocolesterol presente en la piel; este se convierte en calciferol (25-hidroxicolecalciferol, que posteriormente pasa a riñones, por hidroxilación se convierte en 1 α ,25-dihidroxitamina D3 [1,25-(OH)₂D3]/calcitriol, la forma más activa y en 24,25-dihidroxitamina D3 (papel fisiológico indeterminado)³ mediante la regulación de la PTH (hormona paratiroidea).

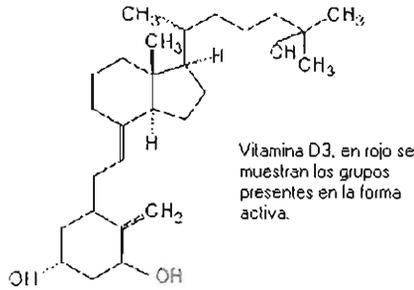


Fig 2.4. Estructura química de la VD3

La forma activa de la vitamina D₃, la 1 α ,25-dihidroxi-vitamina D₃ (VD3), es un importante regulador del metabolismo mineral y de la homeostasis del calcio.^{17, 42} Induce diferenciación de diversas líneas celulares monocíticas como la THP-1, la línea promielomonocítica U-937, la línea mielomonocítica HL-60 y otras líneas hematopoyéticas humanas. La hormona modula varias funciones de los monocitos/macrófagos, como la quimiotaxis, producción de peróxido de hidrógeno, la expresión de marcadores de diferenciación,^{2,26} presentación del antígeno, secreción de prostaglandina E₂ e influencia la actividad de los linfocitos T y B.^{42, 35} Inhibe la proliferación de varias líneas celulares tumorales.¹⁷ Suprime la proliferación de linfocitos, incrementa la fagocitosis y es un regulador negativo de la respuesta inmune adquirida inhibiendo la expresión del MHC de clase II en células presentadoras de antígeno.^{26, 58} En general, esta molécula tiene propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias, así como un papel regulador en el crecimiento y diferenciación en diferentes tipos celulares y tejidos.

2.5.3 Mecanismo de acción

La 25-hidroxitamina D3 1 α -hidroxilasa (1 α -hidroxilasa), es una enzima que se expresada predominantemente en células del túbulo renal proximal en el riñón, y su actividad se ha observado en células inflamatorias del linaje monocito/macrófago, placenta, queratinocitos, células aisladas de la cavidad peritoneal, fibroblastos, células endoteliales y muchas células tumorales.^{42, 54} En la piel la actividad de esta enzima inducida por citocinas inflamatorias actúa como un posible modulador de la adhesión celular en el endotelio.⁴⁹ Es la encargada de la hidroxilación del calciferol a 1(,25(OH)₂D3, la forma activa. La actividad de la 1 α -hidroxilasa renal esta regulada por la hormona paratiroidea (PTH)⁶⁶, calcitonina, calcio, fósforo y la misma 1 α ,25-(OH)₂D3. En los monocitos/macrófagos es sensible a la estimulación por INF γ , y no es estimulada por la PTH, calcio y 1,25-(OH)₂D3.^{42, 46, 49}

La activación del monocito/macrófago esta acompañada por la adquisición de la actividad 1 α -hidroxilasa, capaz de convertir la 25-hidroxitamina D3 en 1 α ,25(OH)₂D3, la forma activa.

La forma activa de la VD3 se une al receptor nuclear de vitamina D (VDR) con alta afinidad ($K_d=10^{-10}$ - 10^{-11}).^{56, 10} Este receptor tiene un peso molecular de 52-56 kDa, es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares-trans para hormonas; que incluyen los receptores de estrógenos, progesterona, glucocorticoides, tiroxina, aldosterona y ácido retinoico.⁵⁵ El receptor tiene un ligando con un -COOH terminal hidrófobo y un dominio de unión a DNA, el cual modula la transcripción de los genes de RNA polimerasa II.⁴⁸ La VD3 se une al VDR, heterodimeriza con el ligando 9-cis del receptor del ácido retinoico (RXR)^{51, 55} el complejo resultante en el núcleo se une a una secuencia de DNA hacia el extremo 5', llamada VDRE (elemento de respuesta para la VD3) para inducir la transcripción¹⁷, actuando como un factor transcripcional dimerico; induciendo la activación o represión de la expresión de genes.⁴⁸ Se ha reportado que bloquea la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, así como una familia de genes de factores de transcripción (EF2), como una subunidad alfa de DNA polimerasa y dos subunidades delta de DNA polimerasa. (Fig 2.5)

En el humano se observan polimorfismos del VDR, las variantes de los genes que lo codifican están asociadas con el incremento o disminución de la expresión del receptor lo cual puede repercutir finalmente en la susceptibilidad o resistencia a varias enfermedades infecciosas, como la tuberculosis pulmonar. Los polimorfismos se identifican como una variación bialélica A, en sitios de enzimas de restricción los cuales alteran la expresión del RNAm del VDR.⁵⁴

La producción extra renal de la $1\alpha,25$ -(OH)₂D3 no contribuye a un incremento en las concentraciones sistémicas en condiciones fisiológicas normales. Las células U937 tratadas con VD3 pueden sufrir inhibición del crecimiento, y expresar varias características de los monocitos maduros inducidos por linfocinas y otras citocinas.

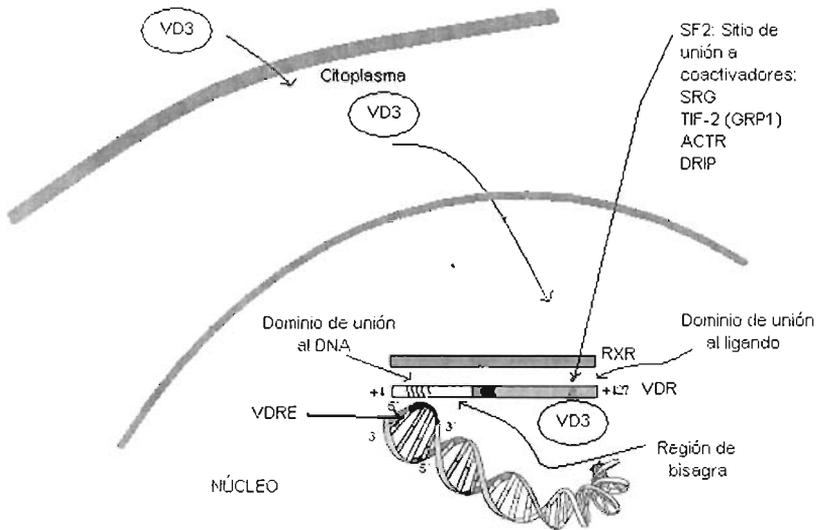


Fig 2.5. Mecanismo de acción de la VD3. La VD3 se une al VDR (receptor de vitamina D3), el cual heterodimeriza con el receptor 9-cis del ácido retinoico (RXR), el complejo resultante en el núcleo se une a secuencias de DNA hacia el extremo 5', llamada VDRE (elemento de respuesta para la VD3) para inducir la transcripción. En el se unen coactivadores o corepresores al sitio SF2 y junto con una maquinaria basal de transcripción se activan o reprimen genes específicos.

2.5.4 Modelo celular de diferenciación

Muchos de los estudios que se han realizado sobre procesos de diferenciación/activación de los fagocitos mononucleares han sido usando diversas líneas celulares provenientes de leucemias humanas que han sufrido un bloqueo en diferentes etapas del proceso de diferenciación; y que además pueden ser inducidas a diferenciarse en macrófagos por diversos estímulos *in vitro*. Estas líneas celulares permiten el estudio de grupos de células relativamente homogéneas a lo largo de los diferentes estadios de diferenciación y maduración. Entre estas líneas celulares tenemos a las U-937 y THP-1, que son células en una etapa promonocítica, con un potencial de maduración hacia las etapas monocítica y macrófaga. Las HL-60 y KG1 pertenecen a un estado blástico, un estado de diferenciación más inmaduro.

La línea celular U-937 expresa varias características de los monocitos diferenciados por linfocitos T y por citocinas.²⁸

En el presente estudio, además de usar los monocitos aislados a partir de sangre periférica, se empleará la línea celular U-937, ya que se tienen estudios previos de diferenciación /activación usando VD3 en el laboratorio y servirá para reafirmar la caracterización de los cambios fenotípicos observados.

Capítulo 3

3.1. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Un componente primordial de los mecanismos de defensa del organismo humano son los distintos tipos de leucocitos. Estas células tienen su origen en la médula ósea a partir de una célula germinal pluripotencial y autorenovable. Bajo la acción de diversas citocinas y factores de crecimiento, en la médula ósea se llevan a cabo los primeros eventos de maduración, generándose distintos fenotipos celulares como monocitos, linfocitos, granulocitos, etc. Los monocitos salen a circulación y pueden migrar a distintos tejidos en los cuales, mediante la acción de diferentes estímulos, se pueden diferenciar a macrófagos. Los macrófagos son una de las primeras líneas de defensa en contra de infecciones.

Se sabe que la vitamina D3 (VD3, una hormona estructuralmente relacionada al colesterol), es un agente inductor de diferenciación para las células monocíticas. En nuestro laboratorio se caracterizaron los cambios fenotípicos asociados a la diferenciación *in vitro* de las células monocíticas U-937 inducidos por la vitamina D3. Las células diferenciadas muestran una serie de características fenotípicas que son distintas a las de las células no diferenciadas, como una mayor capacidad fagocítica, su morfología y su adherencia al plástico.³⁹ Con este modelo, se han obtenido resultados que han demostrado que la señalización a través de los receptores FcγR depende del estado de diferenciación de la célula.²⁷

Para evaluar la generalidad de estos resultados y su validez en células monocíticas normales, es necesario determinar si la VD3 ejerce un efecto similar sobre los monocitos humanos aislados de sangre periférica de donadores. Esto se evaluará mediante la cuantificación de algunos de los cambios producidos durante la diferenciación celular.

3.2 HIPÓTESIS

El tratamiento *in vitro* con $1\alpha,25$ - dihidroxi-vitamina D3 en monocitos humanos aislados de sangre periférica inducirá la diferenciación celular y producirá una población celular con características distintas a la original.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 *Objetivo General*

Caracterizar algunos cambios fenotípicos y funcionales inducidos por la vitamina D3 en monocitos humanos aislados a partir de sangre periférica, comparándolos con los observados en la línea celular U-937 (línea mieloide de origen humano).

3.3.2 *Metas*

1. Aislar poblaciones puras de monocitos humanos a partir de sangre periférica de donadores sanos.
2. Inducir la diferenciación de los monocitos humanos aislados, así como células de la línea celular U-937, mediante el tratamiento con vitamina D3 para obtener poblaciones celulares en diferentes estadios de diferenciación.
3. Caracterizar los cambios producidos en cuanto a:
 - a) Morfología
 - b) Expresión de receptores: Fc γ RI (CD64) y Fc γ RII (CD32).
CR3 (Receptor tipo 3 para complemento)
CD14
HLA-DR
 - c) Capacidad fagocítica.

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS

Para la separación celular por densidad se utilizó la solución de Optiprep™ de la marca Axis Shield ($\delta = 1.317$ g/mL). Para preparar soluciones de Optiprep de distintas densidades (1.078 y 1.068 g/mL) se diluyó la solución original con una solución de HEPES-EDTA-BSA. Para la separación de los monocitos se usó el Monocyte Isolation Kit II, el cual contiene: (a) FcR Blocking Reagent (IgG humana), (b) Monocyte Biotin-Antibody Cocktail (anticuerpos específicos para: CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 y Glicoporina A, marcados con biotina), (c) Anti-Biotin Microbeads (anticuerpos anti-Biotina acoplados a perlas inertes). La columna de separación MS Separation Column MACS se montó en un separador magnético, Magnetic Separator MiniMACS y Multi Stand MACS, todos de la marca Miltenyi Biotec. Para los lavados se utilizó MBS. Para medir la viabilidad celular se usó azul tripan 0.4% (m/v) de Gibco. La $1-\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D3 se obtuvo de Calbiochem.

Para el cultivo de los monocitos y de la línea celular U-937 (obtenida del ATCC (American Type Culture Collection) se utilizó RPMI-1640 suplementado con 10% de suero autólogo o SFB inactivado (Gibco), glutamina, antibióticos (penicilina G 100 U/mL, estreptomycin 100 μ g/mL), aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio.

El TNBS se obtuvo de Eastman KODAK Co. Los eritrocitos de carnero fueron obtenidos de ERIKAR. Los anticuerpos monoclonales anti-DNP 2C5 (IgG1) y 4F8 (IgG2b), así como anti-Fc γ RI (CD64) y anti-Fc γ RII (CD32) fueron producidos en el laboratorio. Los anticuerpos anti-HLA-DR PE (IgG2a) fueron de BD Biosciences y los anticuerpos anti-CD11b-PE (IgG1) y anti-CD14-FITC (IgG2a) se obtuvieron de Immunotech. El anticuerpo secundario usado para la inmunofluorescencia indirecta (FITC-Goat anti-mouse IgG (H+L)) fue obtenido de Zymed. El EDTA, la azida de sodio, y BSA se obtuvieron de SIGMA Chemical Co.

4.2 AISLAMIENTO DE MONOCITOS HUMANOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.

4.2.1 Procedimiento realizado en el banco de sangre.

La sangre fue proporcionada por el banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Esta sangre proviene de donadores voluntarios seleccionados sanos y se recibe en bolsas para fraccionamiento de sangre CPD[♦] (liq.). La sangre se centrifuga en un rotor a 450 xg por 15 min a 4°C, en la cual quedan 3 fracciones en orden de densidad: a) eritrocitos y granulocitos, b) fracción de células blancas, y c) plasma y plaquetas. Se separan las fracciones a temperatura ambiente. La fracción de células blancas, que contiene las células mononucleares, es la fracción a partir de la cual aislamos las células monocíticas. Los estudios que se realizan para determinar que la sangre usada es segura, son ensayos para detección de anticuerpos específicos para VIH, sífilis, hepatitis tipo B y C y brucelosis.

[♦] Solución anticoagulante, la cual contiene: 0.227g de ac. cítrico:H₂O, 0.222g de NaHPO₄:H₂O, 2.550 g de dextrosa H₂O, 0.263 g de Citrato de sodio 2H₂O, cpb100 ml de agua.

4.2.2 Enriquecimiento de las células mononucleares (CMN)

Todo el material que entre en contacto directo con la sangre y sus fracciones deberá ser estéril, de plástico, y no será reutilizado. Después de su uso será esterilizado por autoclave antes de ser desechado.

- a) Obtener el volumen requerido de la fracción de células blancas (usualmente entre 50 y 75 mL a partir de la bolsa de sangre recibida del banco de sangre.
- b) En un tubo de polipropileno de 50 ml adicionar hasta 40 mL de la fracción de células blancas, y el restante en otro tubo. Centrifugar a 550 xg a 20°C por 25 min, en un rotor de columpio sin freno y sin aceleración.
- c) Retirar el suero en un tubo de 50 mL e inactivar a 56°C por 30 min. Centrifugar el suero a 3220 xg por 30 min, retirar el sobrenadante. Usar para complementar el medio.
- d) Retirar la capa de células mononucleares, que corresponden a la capa blanca formada entre el suero y los eritrocitos en el tubo, retirar con pipeta Pasteur y colocar en un tubo de 50 mL. De cada donador colectar aproximadamente 10 mL de concentrado de CMN. Resuspender muy bien y mantener el tubo a 4°C para el paso siguiente.

4.2.3 Centrifugación en gradiente de Optiprep.

Fundamento.

Optiprep™ es una solución de iodixanol ($\delta = 1.317$ g/mL), estéril y libre de endotoxinas usado para formar gradientes *in situ* por centrifugación. La técnica de aislamiento permite la separación de los linfocitos y monocitos de las demás células leucocitarias en base a su tamaño y densidad. Los monocitos constituyen aproximadamente el 8% de la población de leucocitos en sangre. Estos son más grandes que los linfocitos (6-20 μ m) y son ligeramente menos densos. Cuando se adicionan 4 volúmenes de Optiprep™ a 10 volúmenes de suspensión de CMN, la densidad aumenta a 1.1 g/mL. Cuando a esta mezcla se estratifican 2 capas de gradiente de una solución de Optiprep con densidades de 1.078 y 1.068 g/mL y es centrifugada; los leucocitos flotan hasta el plasma, las CMN rápidamente forman una banda en la interfase entre la muestra y la solución con $\delta = 1.078$ g/mL. Los monocitos, debido a su menor densidad, migran a través de la solución y pasan a la segunda solución de $\delta = 1.068$ g/mL; pero aún así es inevitable el paso de algunos linfocitos que hacen que la banda obtenida no corresponda a un solo tipo de población celular.

Los monocitos obtenidos por esta técnica son viables y no han sido activados.²³ Están listos para su posterior purificación.

Procedimiento:

- a) Por cada 10 mL del concentrado de CMN adicionar 4 mL de Optiprep, resuspender muy bien, colocar la mezcla en un tubo nuevo de 50 mL, sin manchar las paredes del tubo.
- b) Cubrir la mezcla con 7.5 mL de la Solución de Optiprep $\delta = 1.078$ g/mL. Depositar encima de esta capa 20 mL de la Solución de Optiprep $\delta = 1.068$ g/mL, estratificando las dos soluciones. Esta capa debe depositarse lentamente, escurriendo por las paredes del tubo y sin gotear. Finalmente cubrir con 0.5 mL de solución de HEPES-EDTA-BSA, estratificado.
- c) Centrifugar a 650 xg a 20°C por 25 min en un rotor de columpio, sin aceleración y sin freno.
- d) Retirar la fracción superior, hasta aproximadamente 12 mL con ayuda de una pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no mezclar las capas formadas.
- e) Lavar la fracción obtenida con PBS a 4°C. En el primer lavado completar el volumen a 40 mL con PBS y centrifugar a 800 xg a 4°C por 5 min. Realizar dos lavados más, cada uno con 10 mL de PBS, centrifugando a 450 xg a 4°C por 3 min.
- f) Resuspender el botón celular y adicionar 10 mL de solución de lisis para hemolizar los eritrocitos, dejar actuar por 3 minutos a temperatura ambiente (Ta) y centrifugar a 450xg a 4°C por 3 min.
- g) Realizar dos lavados más como en (e), pero con un volumen de 20 mL. Tomar una pequeña muestra de las células obtenidas y observar al microscopio óptico, si se observan muchas plaquetas es necesario realizar 1 ó 2 lavados más para eliminarlas por completo.
- h) Contar las células y resuspender en MBS.

Partiendo de estas células el rendimiento de monocitos obtenidos es de un 40-75% del total de las células obtenidas, estas células se utilizarán para la inmunoseparación magnética.

4.2.4 Aislamiento de monocitos por Inmunoseparación magnética.

Fundamento.

Las células no monocíticas son aisladas magnéticamente de manera indirecta. Las células obtenidas en el paso anterior son incubadas con una mezcla de anticuerpos monoclonales marcados con biotina como reactivo primario. La mezcla contiene los siguientes anticuerpos: anti CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 y Glycoporina A. Como reactivo secundario es utilizado un anticuerpo monoclonal anti-biotina conjugados a micro-perlas magnéticas. La suspensión celular se pasa a través de una columna, siendo las células no monocíticas las que quedan retenidas magnéticamente a través de las micro-perlas. Los monocitos no son retenidos en la columna y son colectados en el eluido.

Procedimiento:

- a) Contar las células obtenidas evaluando el porcentaje de viabilidad. De acuerdo a la cantidad aproximada de monocitos que se requieren para los experimentos posteriores, realizar los cálculos correspondientes para determinar el número de células de las que se va a partir para la separación inmuno-magnética.
- b) Tomar un volumen que contenga 10 millones de células. Centrifugar a 200xg a 4°C por 5 min. Diluir en 30 µL de MBS. (Si el número de células es mayor, ajustar los volúmenes correspondientes).
- c) Adicionar 10 µL de FcR Blocking Reagent, homogeneizar.
- d) Adicionar 10 µL del Monocyte Biotin-Antibody Cocktail, homogeneizar e incubar 30 min a 4°C en agitación constante.
- e) Adicionar 30 µL de MBS, mezclar y adicionar 20 µL de Anti-Biotin MicroBeads. Incubar 30 min a 4°C en agitación constante.
- f) Hacer 2 lavados con 2 mL, y un tercero con 3 mL de MBS, centrifugando a 200xg a 4°C por 5 min. Resuspender el botón celular y adicionar 500 µL de MBS.
- g) Lavar la columna de separación con 2 mL de MBS dentro del separador magnético, antes de que se seque la columna adicionar las células resuspendidas poco a poco. La cantidad máxima de células por columna es de 100×10^6 células.
- h) Recibir las células eluidas (fracción negativa, que corresponde a los monocitos) en un tubo en frío, hasta la última gota, adicionar 500µL de MBS y seguir colectando las células eluidas.
- i) Las células que se quedaron unidas a la columna (fracción positiva, principalmente linfocitos y otras células que no son monocitos) se colectan retirando la columna del magneto, adicionando 500µL de MBS y presionando con el émbolo de la columna.

- j) Las células de la fracción negativa (monocitos) se lavan dos veces con PBS a 200xg a 4°C por 3 min. Se cuentan las células y se determina la viabilidad.

4.2.5 Conteo celular y viabilidad.

- a) Resuspender muy bien la muestra de células por contar, tomar una alícuota de 10 μ L en un vial, hacer una dilución 1:1 con solución de azul tripan, resuspender. Tomar 10 μ L y colocar la muestra en la cámara de Neubauer. Realizar el conteo por duplicado, las células que están teñidas de azul son las células muertas.
- b) La cuenta de ambos duplicados no debe tener una diferencia mayor de 4 a 6 células. Si la densidad celular es muy alta (más de 150 células en el campo) repetir el conteo realizando una dilución.

4.3 DIFERENCIACIÓN *in vitro* DE MONOCITOS HUMANOS AISLADOS DE SANGRE PERIFÉRICA (MSP) Y DE CÉLULAS U-937.

4.3.1 Tratamiento con VD3

- a) Cultivar las células U-937 en medio RPMI complementado con 10 % SFB.
- b) Contar las células (U-937 ó MSP).
- c) Colocar 3X10⁶ células en 9 mL de medio de cultivo RPMI complementado (10% de SFB para la línea celular y 10% de suero autólogo para los MSP), en cajas Petri para cultivo de 12 cm de diámetro. A las cajas que van a recibir tratamiento, adicionar 9 μ L de la solución stock de 1- α ,25-dihidroxi vitamina D3 100 μ M, de manera que la concentración final del medio sea de 100 nM.
- d) Las cajas se colocan en una incubadora en atmósfera húmeda a 37°C , 10% CO₂, y a las 24, 48 y 72 horas se realizan las operaciones indicadas a continuación:

4.3.2 A las 24 horas de tratamiento:

- a) Resuspender y retirar 3 mL del medio de cada caja de células U-937 que recibió tratamiento con VD3. Colocar el medio extraído de dos cajas (6mL) en una caja nueva (las cajas originales quedarán con 6 mL de medio cada una). Añadir 3 mL de medio complementado 10% SFB fresco a cada caja y 3 μ L de VD3 a cada una.
- b) Para las células control se repite el paso anterior, pero sin adicionar VD3.
- c) A las cajas con los MSP, resuspender y retirar 3 mL de medio en un tubo estéril marcado para cada caja, centrifugar a 200xg por 3 min, retirar el sobrenadante, resuspender el botón y adicionar 3 mL de medio

complementado. Se vuelven a adicionar a su respectiva caja con 3 μ L de VD3 a cada una.

d) Para las células control se repite el paso anterior, pero sin adicionar VD3.

4.3.3 A las 48 horas de tratamiento

- a) Retirar el medio con las células de las cajas Petri en un tubo estéril marcado para cada caja. Poner 3 mL de medio complementado a cada caja Petri para proteger las células que quedaron mientras se centrifugan los tubos; a 200xg por 3 min.
- b) Regresar las células a la caja Petri correspondiente en 9 mL totales de medio complementado fresco, añadir 9 μ L de VD3 a las que lo requieran. Esto se realiza tanto para las células U-937 como los MSP.
- c) Incubar para el tiempo final de tratamiento: 72 horas.

4.3.4 Recolección de las células y observación morfológica.

- a) Después de incubar las células con y sin VD3 por los tiempos establecidos (24, 48 y 72 horas), observar en el microscopio invertido las células en toda la superficie de la caja y escoger una zona representativa de la misma para tomar la micrografía.
- b) Para recolectar las células, resuspender muy bien, contar y evaluar el porcentaje de viabilidad. En las cajas que se incubaron por 72 horas con VD3 las células usualmente están adheridas a la placa. Si este es el caso, colocar la caja sobre hielo por 5 minutos, y despegar las células por pipeteo. Si después de esto todavía se observan células adheridas, será necesario retirar el medio con las células, adicionar 3 mL de medio frío nuevo y con un gendarme despegar las células y juntarlas con las restantes.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA POR INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA E INDIRECTA.

4.4.1 Tinción directa e indirecta.

- a) De la suspensión de células, contar y resuspender en amortiguador de lavados a una concentración de 2×10^6 células/mL y colocar 200,000 células por tubo (Tubo Falcon de poliestireno) ó 100 μ L de la suspensión celular.
- b) Durante todo el experimento los tubos se mantendrán a 4°C y protegidos de la luz.

Realizar cuatro tubos control con los siguientes reactivos:

- Tubo1 Sólo contendrá la suspensión celular.
- Tubo 2 Control de segundo anticuerpo: suspensión celular + FITC-Goat Anti-ratón
- Tubo 3 Control de isotipo: suspensión celular + IgG anti-DNP + FITC-Goat Anti-ratón

- Tubo 4 (Cuando se realizan tinciones dobles, se utiliza para realizar la compensación): suspensión celular + anti-IgG-PE y anti-IgG-FITC
- c) Colocar a los tubos correspondientes 10 μg del anticuerpo específico para el antígeno de superficie de las células, resuspendiendo muy bien. Para los anticuerpos con marcaje directo se coloca la cantidad indicada por el fabricante.
 - d) Incubar 30 min a 4°C con agitación ocasional.
 - e) Adicionar 200 μL de solución amortiguadora de lavados, centrifugar 200xg por 3 min a 4°C. Retirar el sobrenadante y lavar dos veces con 300 μL de buffer de lavados, centrifugar a 200xg a 4°C por 3 min. Para los anticuerpos con marcaje directo el último lavado se realiza con PBS y se prosigue a la fijación. Para tinciones indirectas, continuar con el paso (f).
 - f) Diluir el segundo anticuerpo, anti-IgG FITC 1:200 en solución amortiguadora de lavados (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y adicionar 200 μL a los tubos correspondientes (sólo para la inmunofluorescencia indirecta). Incubar como en el paso (d).
 - g) Realizar los lavados como en el paso (e).

4.4.2 Fijación de células teñidas.

- a) Retirar el sobrenadante y adicionar a todos los tubos 300 μL de solución de PFA 1%, e incubar 20 min a 4°C.
- b) Realizar dos los lavados con PBS como en el paso 4.4.1 (e).
- c) Resuspender las células en 200 μL con PBS. Mantener las células protegidas de la luz a 4°C por un período máximo de 7 días.
- d) Analizar la fluorescencia de 10000 células en el citómetro de flujo (FACS Scan).

4.5 FAGOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES $Fc\gamma$ EN CÉLULAS U-937 Y MSP EN SUSPENSIÓN.

4.5.1 Almacenamiento de los eritrocitos.

La sangre de carnero con anticoagulante se obtiene comercialmente. En condiciones de esterilidad, diluir la sangre de carnero 1:2 en solución de Alsever's y almacenar en refrigeración protegida de la luz. Su vida útil en estas condiciones es de aproximadamente 4 semanas.

4.5.2 Sensibilización de eritrocitos con ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS)

- a) Medir 15 mL de la suspensión de eritrocitos que están en Alsever's y llevarlos a 40 mL con DGVB+.
- b) Centrifugar la suspensión a 3220xg a 4°C por 12 min.
- c) Decantar el sobrenadante, resuspender el botón y lavar adicionando 40 mL de DGVB+, centrifugar como en el paso (b). El sobrenadante deberá

- permanecer transparente después de este lavado. De lo contrario lavar nuevamente con DGVB+, y si la hemólisis continúa desechar los eritrocitos.
- d) Lavar con 20 mL de DGVB+ y 20 mL de solución amortiguadora de boratos. Medir el volumen del botón de eritrocitos y retirar el sobrenadante.
 - e) Descompactar el botón y añadir 7 mL de la solución de TNBS por cada mL de botón de eritrocitos. Incubar por 10 min, Ta, en agitación suave protegidos de la luz. Centrifugar como en el paso (b).
 - f) Lavar como en el paso (d).
 - g) Lavar como en el paso (c) una o dos veces (el sobrenadante debe permanecer transparente).
 - h) Mantener los eritrocitos en DGVB+ a 4°C protegidos de la luz. Su vida útil es de 1 semana.

4.5.3 Título de hemaglutinación.

Fundamento.

Al reaccionar anticuerpos dirigidos contra algún antígeno que se localice en la superficie membranal de los eritrocitos se induce la formación de una malla celular. Esto produce la aglutinación macroscópica de los eritrocitos debida a la interacción antígeno-anticuerpo, hasta un punto en que la concentración de anticuerpo es tan baja que no existen suficientes moléculas para formar la malla. El título de hemaglutinación se define como la concentración más baja de anticuerpo capaz de provocar la aglutinación de los eritrocitos de prueba.

Procedimiento:

- a) En un vial tomar en condiciones estériles 1.5 mL de la suspensión de eritrocitos sensibilizados.
- b) Centrifugar por aproximadamente 40 seg en la picofuga, resuspender y hacer dos lavados con medio sin complementar; el sobrenadante deberá permanecer transparente.
- c) Resuspender el botón de eritrocitos al 2% en medio de cultivo completo.
- d) En placas de 96 pozos con fondo en V colocar 50 µl de medio en las columnas 2 a la 12, y 100µl en la primera columna.
- e) Realizar los cálculos necesarios para colocar 20 µg del anticuerpo IgG anti-DNP en el pozo 1. El volumen que se va a adicionar se tiene que retirar de medio y sustituirlo por el volumen de anticuerpo. Se realiza por triplicado.
- f) Preparación de las diluciones seriadas: Mezclar muy bien el anticuerpo y pasar 50 µl del pozo de la primera columna (columna 1) al pozo siguiente (columna 2), mezclar muy bien y pasar 50 µl a el pozo 3 y así sucesivamente hasta el pozo 12. Las diluciones correspondientes serían: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 etc.
- g) Como control negativo dejar una fila únicamente con medio.
- h) Añadir 50 µl de eritrocitos al 2% en cada pozo.
- i) Incubar en incubadora húmeda 1 h a 37°C, 10% CO₂, tiempo suficiente para que se forme el botón de eritrocitos del control negativo.

El título de hemaglutinación es la concentración más baja de anticuerpo con la cual aun se forma la red de eritrocitos-anticuerpo (aglutinación macroscópica)

4.5.4 Oponización de los eritrocitos sensibilizados.

Los eritrocitos sensibilizados se oponizan por incubación con la concentración subhemaglutinante de anticuerpo.

- a) Adicionar el volumen requerido de la suspensión de eritrocitos al 2% en un vial de 1.5 mL. Adicionar la cantidad necesaria de anticuerpo para que la concentración final sea igual a la concentración subhemaglutinante
- b) Incubar los eritrocitos con el anticuerpo, y eritrocitos solos para el control negativo, por una hora a temperatura ambiente, en agitación suave y protegidos de la luz.
- c) Para eliminar el anticuerpo libre dar un pulso en la picofuga a los viales, y resuspender los eritrocitos en medio para obtener nuevamente una concentración final de eritrocitos al 2 %.

4.5.5 Fagocitosis.

Fundamento

La interacción de los eritrocitos opsonizados con IgG y los receptores específicos para la porción Fc localizados en la membrana de la célula monocítica, activa una serie de eventos bioquímicos intracelulares que culminan en la internalización del eritrocito.

Procedimiento:

- a) Resuspender las células fagocíticas a una concentración de 1×10^6 células/mL con medio complementado (10% SFB o suero autólogo).
- b) Colocar 100 μ L de la suspensión celular en tubos Eppendorf de 1.5 mL, mantener en incubación de 30 a 60 min en la incubadora húmeda a 37°C y 10% CO₂.
- c) Adicionar 20 μ L de los eritrocitos al 2% opsonizados y sin opsonizar (control negativo) y resuspender.
- d) Centrifugar los tubos con 3 pulsos de 3 seg cada uno en la picofuga para aumentar el contacto entre las células y los eritrocitos, pero evitando que el botón sea muy compacto.
- e) Incubar los tubos por 1 h en la incubadora húmeda a 37°C y 10% CO₂.
- f) Adicionar 500 μ L de la solución de lisis, resuspendiendo el botón de células-eritrocitos, incubar por 15 seg y centrifugar en la picofuga hasta observar el botón celular. Es recomendable no dejar las células más de 15 seg con la solución de lisis, pues las células se maltratan demasiado.

- g) Adicionar 100 μ L de medio complementado (10% SFB o suero autólogo), resuspender y colocar en una placa de fondo plano de 96 pozos.
- h) Evaluar microscópicamente la fagocitosis, contando el número de eritrocitos fagocitados por célula en al menos 100 células de diferentes zonas de cada pozo.

CAPITULO 5

RESULTADOS

5.1 CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR VD3

La vitamina D3 como agente inductor de diferenciación de células monocíticas provoca cambios en su morfología y en la velocidad de proliferación celular, los cuales son fácilmente detectables. Como un paso inicial para la caracterización del efecto diferenciador de la VD3 sobre los monocitos humanos de sangre periférica y la línea celular U-937 se determinó la presencia de cambios morfológicos.

Las células de la línea U-937 y los monocitos de sangre periférica incubados durante 72 horas con VD3 fueron observados al microscopio óptico para la detección de cambios en su morfología. Los cambios se registraron en micrografías de campos representativos de la población celular presente, a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

Experimentos previos en el laboratorio habían indicado que la concentración 100 nM de VD3, es adecuada para provocar cambios relacionados a la diferenciación de las células U-937. Por lo tanto se utilizó esta concentración en los experimentos con los monocitos de sangre periférica y células U-937.³⁹

La viabilidad celular durante el tratamiento con VD3 se determinó con azul tripan. Para la línea U-937 se obtuvo un 95% de viabilidad y para los monocitos humanos de sangre periférica un 85% a las 72 horas de cultivo (datos no mostrados).

Los cambios morfológicos observados en los monocitos humanos de sangre periférica y las células U-937 se pueden apreciar en las figuras 5.1.1 y 5.1.2, en donde se observa la morfología de las células sin tratamiento. Los monocitos humanos son más pequeños que las células U-937 y tienen una forma más redondeada. A las 24 horas en cultivo los monocitos humanos de sangre periférica se encuentran adheridos en la superficie de la caja de cultivo. Los que fueron tratados con VD3 aparte de estar adheridos, empiezan a formar pequeños agregados celulares (aproximadamente un 20% de células).

A las 48 horas de incubación sin VD3 los monocitos se encuentran más adheridos y se empiezan a agregar (aproximadamente un 20%), su citoplasma es más abundante (son más voluminosas). Los tratados con VD3 siguen agregándose más (hasta un 60%), su contorno es más irregular y su citoplasma

es muy abundante. Finalmente a las 72 horas en cultivo algunos monocitos sin tratamiento siguen adheridos, la mayoría se encuentran en suspensión; ya no se observan en agregados. Las células que recibieron el tratamiento con VD3 siguen adheridas en la superficie de la caja de cultivo, algunas de las cuales se expanden y se tornan alargadas (aproximadamente un 30%), su citoplasma es mucho más abundante; también se observan algunas células en suspensión.

Las células U-937 son originalmente de mayor tamaño un poco más grandes que los monocitos de sangre periférica y tienen forma más irregular. A las 24 horas de tratamiento con VD3 se observa su contorno más irregular que el control, a las 48 horas es más evidente este cambio y algunas células empiezan a agregarse; también se observa una disminución de su proliferación celular. A las 72 horas se observa en algunas células un citoplasma más abundante y adherencia en la superficie de la caja de cultivo, siguen formándose acúmulos de células y la disminución de la proliferación celular es bastante evidente.

Uno de los parámetros de diferenciación en las células U-937 es la disminución de la proliferación celular, en los monocitos de sangre periférica estos cambios no se observaron, ya que bajo las condiciones de cultivo no proliferan.

Estos resultados demuestran que al igual que las células U-937, los monocitos humanos aislados de sangre periférica responden al tratamiento con VD3 mostrando cambios morfológicos sugerentes de un estado más diferenciado.

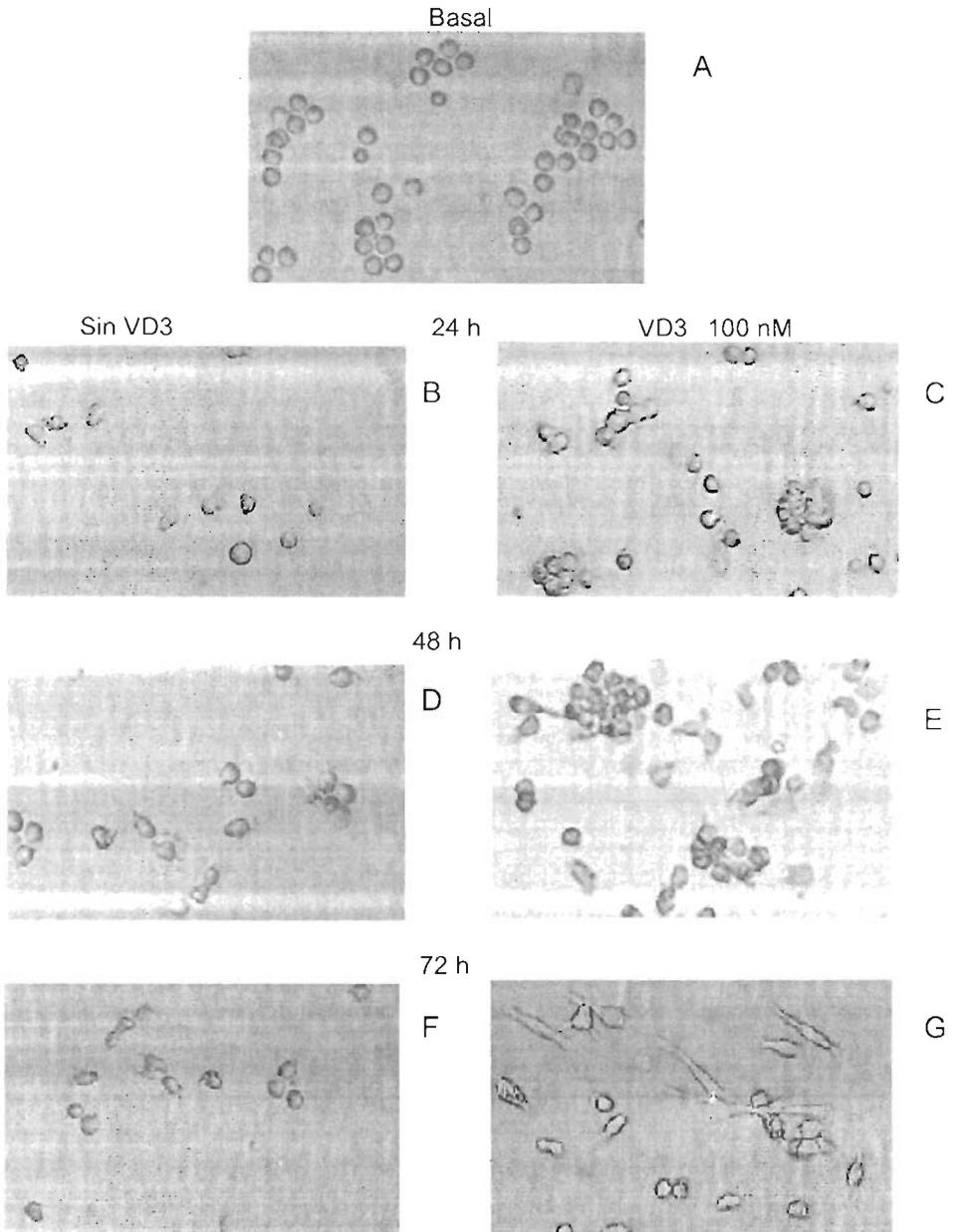
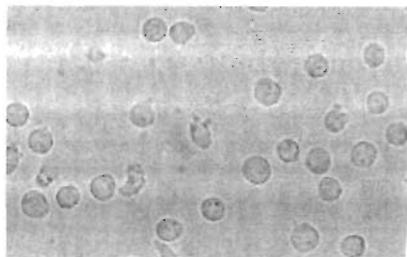


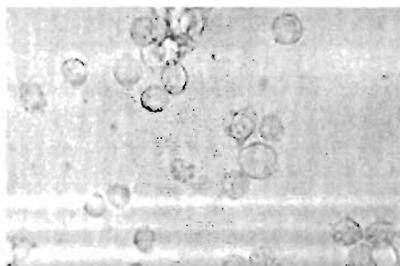
Fig. 5.1.1 Morfología de los monocitos humanos de sangre periférica a los distintos tiempos de tratamiento con VD3. Imágenes microscópicas tomadas de los monocitos de sangre periférica a niveles basales (A), y los cambios morfológicos observados a las 24 (B), 48 (D) y 72 h (F) en cultivo; así como los que recibieron tratamiento con VD3 durante las 24 (C), 48 (E) y 72 h (G). (Aumento 400x)



A

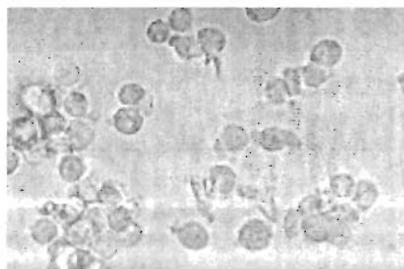
Basal

VD₃ 100 nM



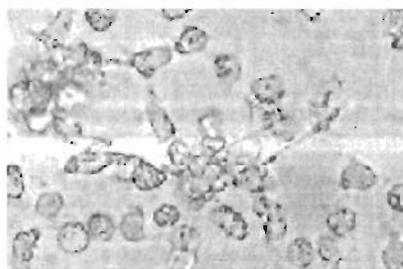
B

24 h



C

48 h



D

72 h

Fig. 5.1.2 Morfología de las células U-937 a los distintos tiempos de tratamiento. Imágenes microscópicas que muestran los cambios morfológicos observados de las células U-937 (A), a los tiempos de 24 (B), 48 (C) y 72 h (D) durante el tiempo de incubación con VD₃. (Aumento 400x)

5.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES $Fc\gamma RI$ y $Fc\gamma RII$, CR3, CD14 y HLA-DR A LOS DISTINTOS TIEMPOS DE TRATAMIENTO CON VD3

Dentro de las moléculas que se expresan en la membrana de los monocitos/macrófagos se encuentran una gran variedad de receptores que determinan el control de diversas actividades. La modificación de la expresión de receptores es un importante marcador de diferenciación celular, dichos cambios pueden ser indicativos del estado de maduración en el que se encuentre la célula.

Se evaluó la expresión de los receptores: $Fc\gamma RI$ y $Fc\gamma RII$ (receptor de la fracción cristalizante de la inmunoglobulina G), y la del receptor CR3 (tipo tres del complemento); los cuales están involucrados en la ingestión de partículas opsonizadas con IgG o fragmentos del complemento respectivamente. El CD14 (receptor de lipopolisacárido), relacionado con el nivel de maduración/diferenciación de los monocitos maduros y macrófagos. Finalmente la molécula codificada por la región del MHC tipo II, (HLA-D, receptor antígeno leucocitario) que se relaciona con la presentación del antígeno.

Se usaron anticuerpos específicos para los distintos receptores de la superficie celular de los monocitos/macrófagos para evaluar su nivel de expresión por citometría de flujo. Después de una adecuada compensación en verde, para el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína), y verde-rojo para las doblemente marcadas con FITC y PE (ficoeritrina); la intensidad de fluorescencia fue analizada en base a los controles de isotipo y de células.

Los resultados se muestran en los histogramas (Fig. 5.2.11, 5.2.12, 5.2.13), uno representativo para cada receptor evaluado a los tiempos de incubación de 24, 48 y 72 horas con o sin VD3. Los datos corresponden para el mismo donador o número de experimento ya sean monocitos de sangre periférica o células U-937. En estos los histogramas están indicados la distribución de la fluorescencia tanto del control de isotipo como de anticuerpo específico para el receptor evaluado. El nivel de expresión del receptor a nivel basal corresponde al de los monocitos humanos recién aislados (frescos) y que no han estado en incubación.

En los gráficos se muestra el nivel de expresión relativo del receptor, el cual se obtiene del cociente del valor de la intensidad media de fluorescencia del tubo muestra sobre el valor de la intensidad media de fluorescencia del tubo de un mismo isotipo. El nivel de expresión relativo se indica para cada donador y experimento con las células U-937, también se muestra la media \pm D.S. del total de experimentos realizados al tiempo de tratamiento. El análisis estadístico llevado a cabo fue usando la prueba t de Student para dos datos pareados. Estos datos también se graficaron de manera individual para cada experimento realizado (donador o células U-937 vs. nivel de expresión relativo), con el fin de visualizar de una mejor manera los cambios en el nivel de expresión de los receptores evaluados.

Los experimentos con las células U-937 se realizaron en paralelo con algunos de los experimentos de los monocitos de sangre periférica.

-CD14

Los niveles de expresión del CD14 (Fig. 5.2.1) muestran diferencias significativas en los monocitos humanos a las 24 y 48 horas de tratamiento con VD3; y en las células U-937 a los tres tiempos evaluados. También se muestran estos datos graficados de manera individual (Fig. 5.2.2).

Los niveles de expresión basales de CD14 en los monocitos humanos de sangre periférica son de 3 a 10 veces mayores que en las células U-937. Estos niveles llegan a aumentar hasta 12 veces respecto a las células U-937 a las 72 horas de tratamiento con VD3.

-FcγR's

En cuanto a la expresión de los receptores FcγRI y el FcγRII, para el primero (Fig. 5.2.3); no hay diferencias significativas por el tratamiento con la VD3 a los diferentes tiempos evaluados, ni en los monocitos de sangre periférica ni en las células U-937. Para el FcγRII (Fig. 5.2.5) a las 72 horas de tratamiento con VD3 hay diferencia significativa en los monocitos humanos mientras que en las células U-937 al tiempo de 24 y 48 horas las hay. El nivel de expresión de estos receptores es aproximadamente el doble en los monocitos humanos de sangre periférica que en las células U-937. Se puede apreciar que los resultados con el FcγRI en forma individual no tienen un gran aumento con la VD3 en los monocitos humanos, aunque el nivel de expresión de cada donador sea diferente. Los cambios mencionados para el FcγRII también se aprecian en forma individual (Fig. 5.2.4 y 5.2.6).

-HLA-DR

El nivel de expresión relativo para el HLA-DR en los monocitos humanos de sangre periférica (Fig. 5.2.7) aumenta significativamente respecto al control a las 24 y 48 horas, a las 72 horas no es significativo el aumento, aunque en los experimentos de los donadores observados en forma individual (Fig. 5.2.8) parecen no mostrar incrementos en los tres tiempos de tratamiento. En cuanto a las células U-937, hasta las 48 horas hay un aumento significativo respecto al control, y a las 72 horas este efecto desaparece. Estos datos observándolos en forma individual (Fig. 5.2.8) no muestran una diferencia clara, hubiera sido necesario haber realizado más experimentos con este marcador para poder determinar de una forma más precisa los niveles de expresión del mismo.

-CR3

Respecto al receptor tipo tres del complemento, CR3 (Fig. 5.3.9); en los monocitos de sangre periférica los niveles de expresión relativa no cambian significativamente para los tiempos a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento evaluados. Si observamos estos datos en forma individual, parece no haber cambios en el nivel de expresión relativo a las 24 horas, incluso parece disminuir

respecto al control, a las 48 horas hay un aumento en dos donadores de tres analizados con la VD3, y a las 72 horas con y sin tratamiento nuevamente no se observan cambios en el nivel de expresión relativo (Fig. 5.3.10).

En las células U-937, el nivel de expresión relativo del CR3 aumenta con el tiempo de tratamiento, hasta 6 veces respecto a los niveles basales, este incremento es significativo respecto al control a las 48 y 72 horas de tratamiento.

En la siguiente Tabla se resumen las observaciones detalladas arriba

Tabla 5.2.1 Resumen del efecto de la VD3 sobre la expresión de los receptores celulares.

Receptor	Tiempo (horas)	MONOCITOS		U-937	
		No.A	p _{0.05}	No. A.	p _{0.05}
CD14	24	↑	3.22 *	↑	2.62 *
	48	↑	2.82 *	↑	4.08 *
	72	↑	3.65	↑	6.48 *
FcγRI	24	≈	1.35	≈	0.95
	48	≈	1.05	↑	1.67
	72	≈	0.90	≈	1.40
FcγRII	24	≈	1.42	↑	1.95 *
	48	≈	1.28	≈	1.30 *
	72	↑	2.25 *	↑	1.80 *
HLA-DR	24	↑	1.96 *		N.D.
	48	↑	1.85 *	↑	3.66
	72	↑	4.63	↑	3.81
CR3	24	↓	0.52		N.D.
	48	↑	1.58	↑	4.79 *
	72	≈	1.05	↑	4.73 *

Se muestra el número de veces que aumenta la expresión del receptor (No.A) en las células con VD3 respecto a las que no recibieron la VD3 al tiempo de tratamiento indicado. El aumento ↑, disminución ↓, y sin cambio ≈ en la expresión del receptor está indicado. *P<0.05 comparada con las células que no recibieron tratamiento. Este dato es la división del nivel de expresión relativo promedio al tiempo y receptor indicados con VD3 entre las que no la recibieron. (N.D. No determinado.)

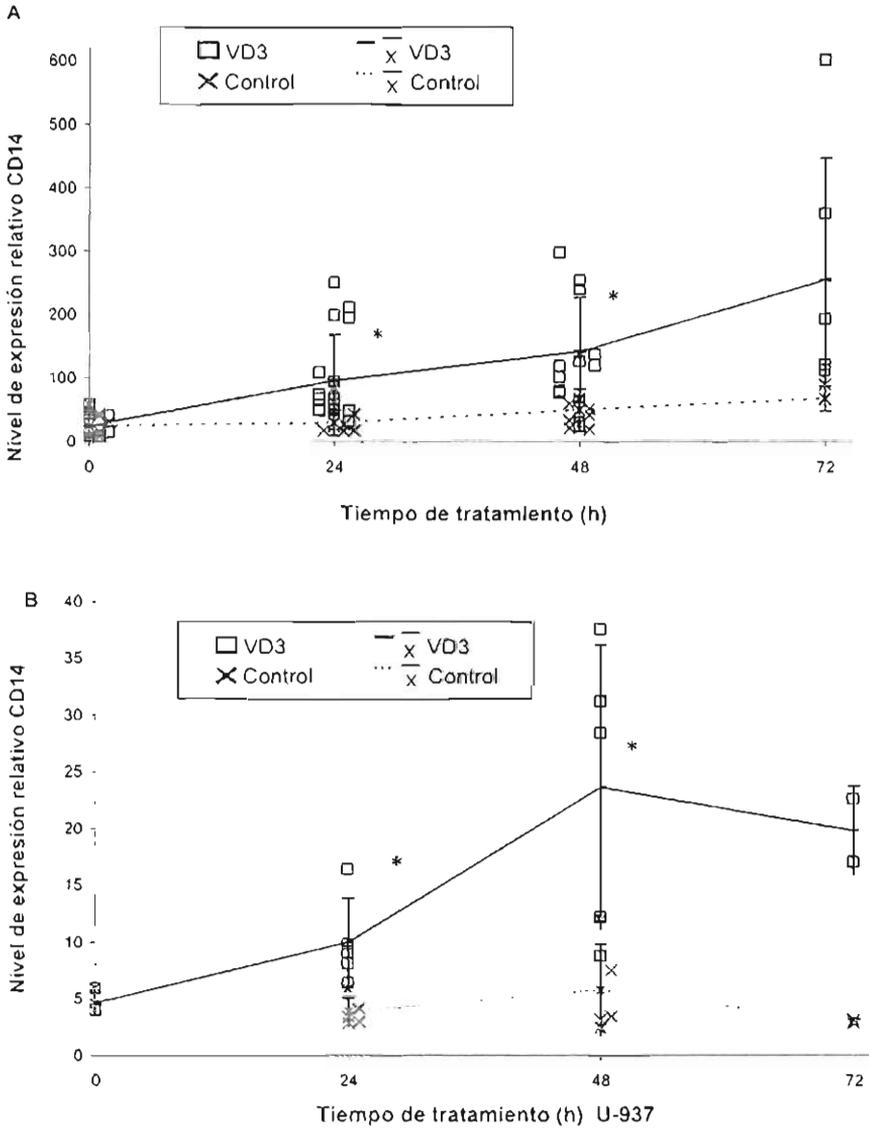


Fig. 5.2.1 Efecto de la VD3 sobre la expresión de CD14 en monocitos humanos de sangre periférica y la línea celular U-937. Se indica el nivel de expresión relativo de CD14 en (A) monocitos humanos de sangre periférica y en (B) células U-937, a nivel basal y a los tiempos de 24, 48 y 72 h. de tratamiento con y sin VD3. También se indica la media \pm D.S. de los valores del total de experimentos realizados al tiempo de tratamiento. * $P < 0.05$ comparada con las células que no recibieron tratamiento. Recordar que el nivel de expresión relativo del receptor se obtiene del cociente del valor de la intensidad media de fluorescencia del tubo muestra sobre el valor de la intensidad media de fluorescencia del tubo de un mismo isotipo (Control de isotipo), esto es para todos los gráficos mostrados.

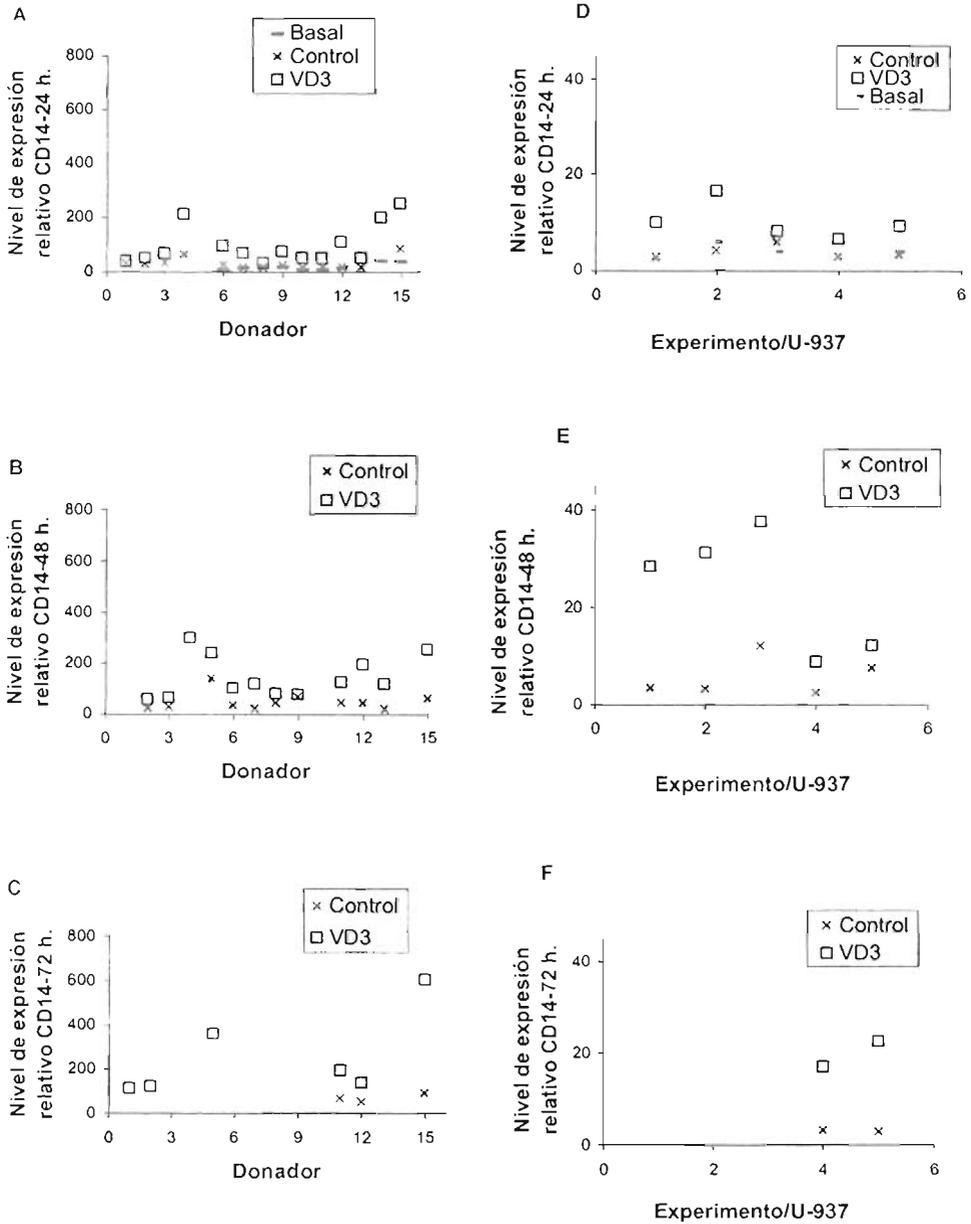


Fig. 5.2.2 Efecto de la VD3 en la expresión de CD14 en monocitos humanos de sangre periférica y la línea celular U-937. Los datos se grafican de manera individual, y se muestra el nivel de expresión relativo a las 24 h en los monocitos humanos (A, N=16) y en las células U-937 (B, N=5) a las 48 h (B, N=16) (E, N=5) y 72 h (C, N=6) (F, N=2) de tratamiento con y sin VD3.

Tabla 5.2.2 Efecto de la VD3 sobre la expresión de CD14 evaluado en los monocitos humanos de sangre periférica y la línea U-937.

MONOCITOS HUMANOS							
BASAL		24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		Control	VD3	Control	VD3	Control	VD3
<i>EXP</i>	Nivel de expresión relativo						
1	58.76	30.75	37.05	N.D.	N.D.	ND.	112.88
2	N.D.	27.10	49.02	24.63	56.78	ND.	121.69
3	43.98	31.51	67.11	27.32	64.37	ND.	ND.
4	ND.	62.34	211.34	N.D.	299.30	ND.	ND.
5	ND.	ND.	ND.	137.76	240.74	ND.	361.81
6	7.75	26.29	94.60	33.86	101.63	ND.	ND.
7	14.89	15.97	67.53	21.43	119.78	ND.	ND.
8	15.98	17.12	31.96	42.54	80.23	ND.	ND.
9	17.80	23.73	73.99	67.46	77.48	ND.	ND.
10	8.96	16.20	51.07	ND.	ND.	ND.	ND.
11	8.82	17.39	49.03	43.56	126.36	66.69	193.93
12	15.13	17.57	109.17	42.75	194.86	52.23	137.39
13	ND.	17.38	50.98	19.81	118.89	ND.	ND.
14	40.82	ND.	199.00	ND.	ND.	ND.	ND.
15	38.54	83.96	251.06	60.09	254.29	90.69	604.36
\bar{x}	24.67	29.79	95.92	50.30	141.88	69.87	255.34
D.S.	17.56	20.5	71.41	32.87	85.59	19.43	194.42
U-937							
BASAL		24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		Control	VD3	Control	VD3	Control	VD3
<i>EXP</i>	Nivel de expresión relativo						
1	N.D.	2.80	9.88	3.54	28.48	N.D.	N.D.
2	5.94	4.12	16.50	3.26	31.28	N.D.	N.D.
3	4.01	5.95	8.17	12.14	37.65	N.D.	N.D.
4	N.D.	2.94	6.45	2.50	8.83	3.20	17.13
5	3.95	3.36	9.20	7.59	12.24	2.94	22.66
\bar{x}	4.63	3.83	10.04	5.80	23.69	3.07	19.90
D.S.	1.13	1.29	3.84	4.06	12.52	0.18	3.91

Se muestran en los monocitos humanos de sangre periférica y en las células U-937, el nivel de expresión relativo basal de CD14 a las 24, 48 y 72 horas en incubación con o sin VD3; así como la media y la desviación estándar (D. S.).
(N.D. No determinado)

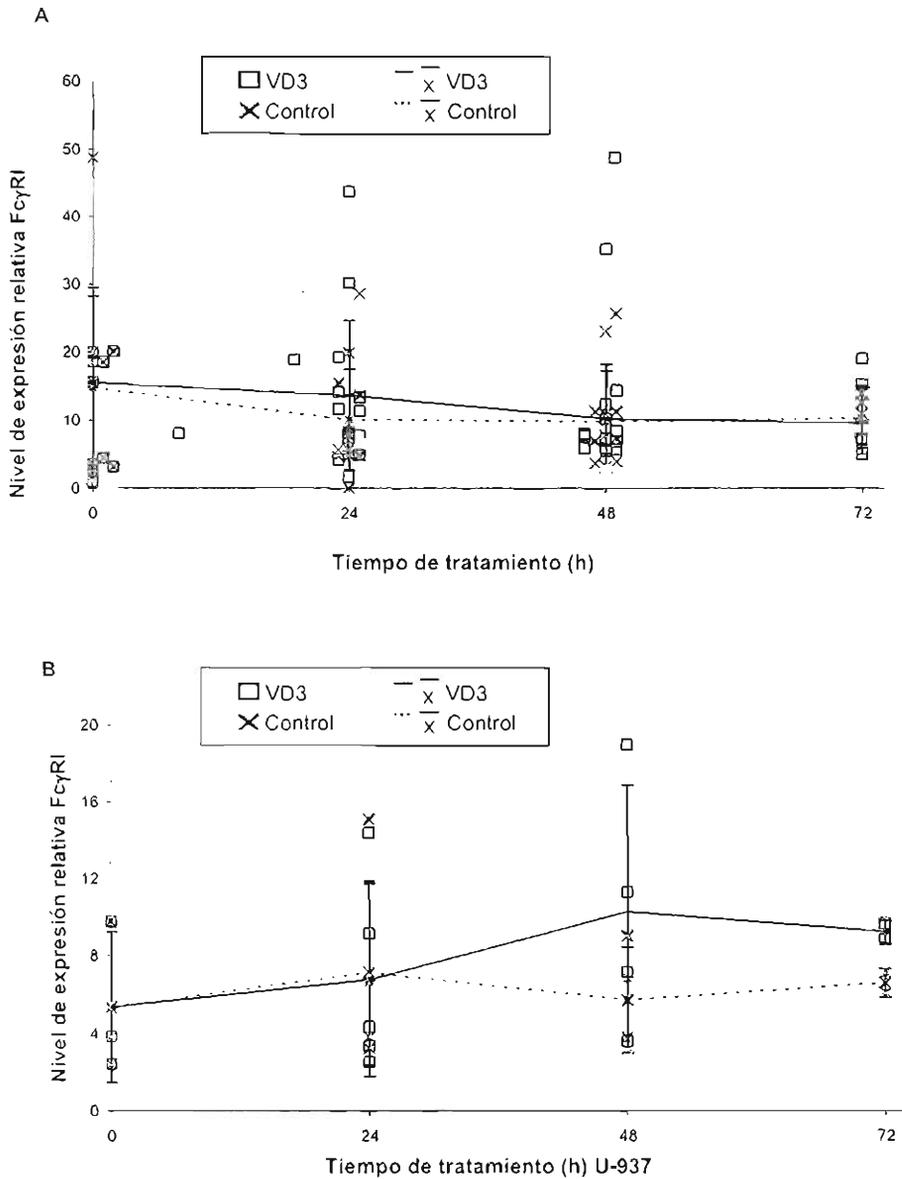


Fig. 5.2.3 Efecto de la VD3 sobre la expresión del Fc γ RI en monocitos humanos de sangre periférica y la línea celular U-937. Se indica el nivel de expresión relativo del Fc γ RI en (A) monocitos humanos de sangre periférica y en (B) células U-937, a nivel basal y a los tiempos de 24, 48 y 72 h de tratamiento con y sin VD3. También se indica la media \pm D.S. de los valores del total de experimentos realizados al tiempo de tratamiento. * $P < 0.05$ comparada con las células que no recibieron tratamiento.

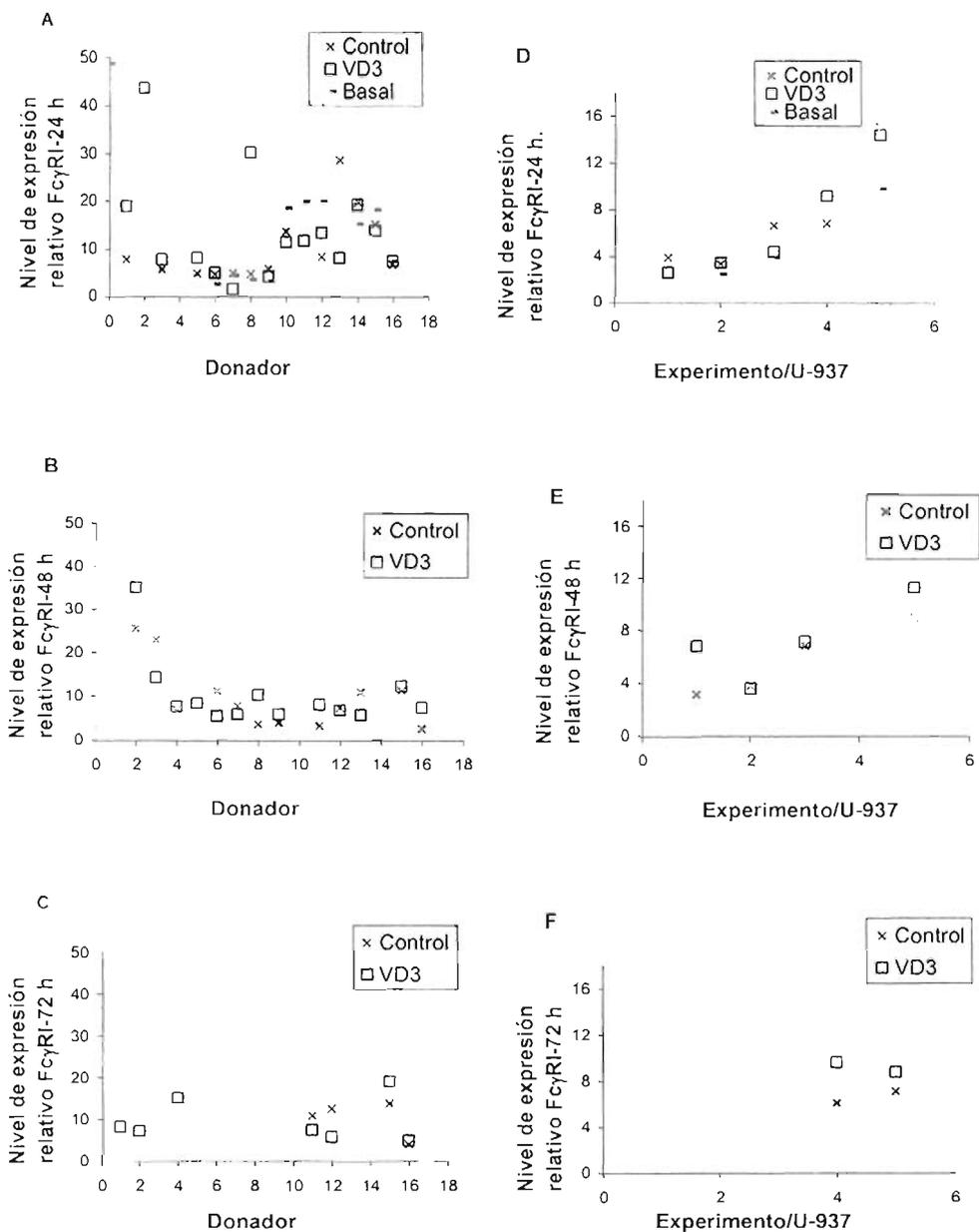


Fig. 5.2.4 Efecto de la VD3 en la expresión del Fc γ RI (CD64) en monocitos humanos de sangre periférica y la línea celular U-937. Los datos se grafican de manera individual, se muestra el nivel de expresión relativo a las 24 h en los monocitos humanos (A, N=16) y en las células U-937 (B, N=5) a las 48 h (B, N=16) (E, N=4) y 72 h (C, N=7) (F, N=2) de tratamiento con y sin VD3.

Tabla 5.2.3 Efecto de la VD3 sobre la expresión del FcγRI (CD64) en monocitos humanos de sangre periférica y la línea U-937.

MONOCITOS HUMANOS							
	BASAL	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		Control	VD3	Control	VD3	Control	VD3
<i>EXP</i>	Nivel de expresión relativo						
1	48.80	7.80	18.92	N.D.	N.D.	N.D.	8.11
2	N.D.		43.69	25.58	35.15	N.D.	7.13
3	N.D.	5.69	7.73	23.05	14.38	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.	6.99	7.71	N.D.	15.19
5	N.D.	4.82	8.06	N.D.	8.49	N.D.	N.D.
6	2.63	4.63	4.89	11.27	5.46	N.D.	N.D.
7	4.46	4.92	1.62	7.82	5.89	N.D.	N.D.
8	3.52	4.75	30.19	3.67	10.23	N.D.	N.D.
9	3.18	5.74	4.19	3.97	5.90	N.D.	N.D.
10	18.57	13.69	11.40	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	19.97	N.D.	11.66	3.23	8.06	10.94	7.41
12	20.10	8.26	13.36	7.30	6.83	12.60	5.74
13	N.D.	28.66	8.03	10.88	5.71	N.D.	N.D.
14	15.57	19.93	19.28	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15	18.51	15.47	14.20	11.33	12.34	13.86	19.05
16	7.34	6.75	7.44	2.59	7.34	4.01	4.94
\bar{x}	14.79	10.08	13.64	9.81	10.27	10.35	9.65
D.S.	13.46	7.38	10.99	7.48	7.95	4.39	5.33
U-937							
	BASAL	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		Control	VD3	Control	VD3	Control	VD3
<i>EXP</i>	Nivel de expresión relativo						
1	N.D.	3.83	2.52	3.20	6.81	N.D.	N.D.
2	2.43	3.26	3.38	3.81	3.60	N.D.	N.D.
3	3.86	6.62	4.34	6.83	7.14	N.D.	N.D.
4	N.D.	6.78	9.14	N.D.	19.01	6.07	9.63
5	9.76	15.11	14.39	9.02	11.30	7.10	8.81
\bar{x}	5.35	7.12	6.75	5.72	9.57	6.58	9.22
D.S.	3.88	4.74	4.98	2.72	5.94	0.73	0.58

Se muestran en los monocitos humanos de sangre periférica y en las células U-937, el nivel de expresión relativo basal del FcγRI y a las 24, 48 y 72 horas en incubación con ó sin VD3; así como la media y la desviación estándar (D. S.). (N.D. No determinado)

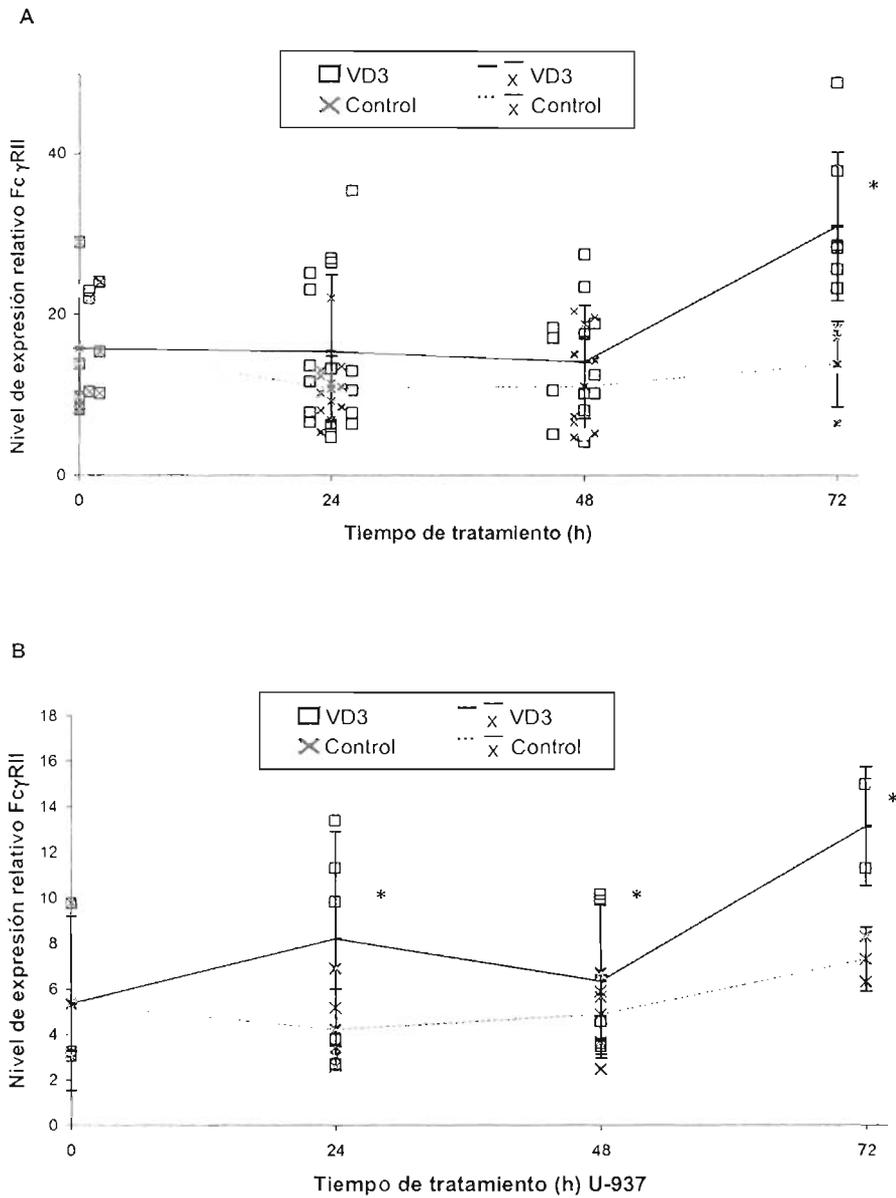


Fig. 5.2.5 Efecto de la VD3 sobre la expresión del Fc γ RII en monocitos humanos de sangre periférica y la línea celular U-937. Se indica el nivel de expresión relativo del Fc γ RII en (A) monocitos humanos de sangre periférica y en (B) células U-937, a nivel basal y a los tiempos de 24, 48 y 72 h de tratamiento con y sin VD3. También se indica la media \pm D.S. de los valores del total de experimentos realizados al tiempo de tratamiento. *P<0.05 comparada con las células que no recibieron tratamiento.

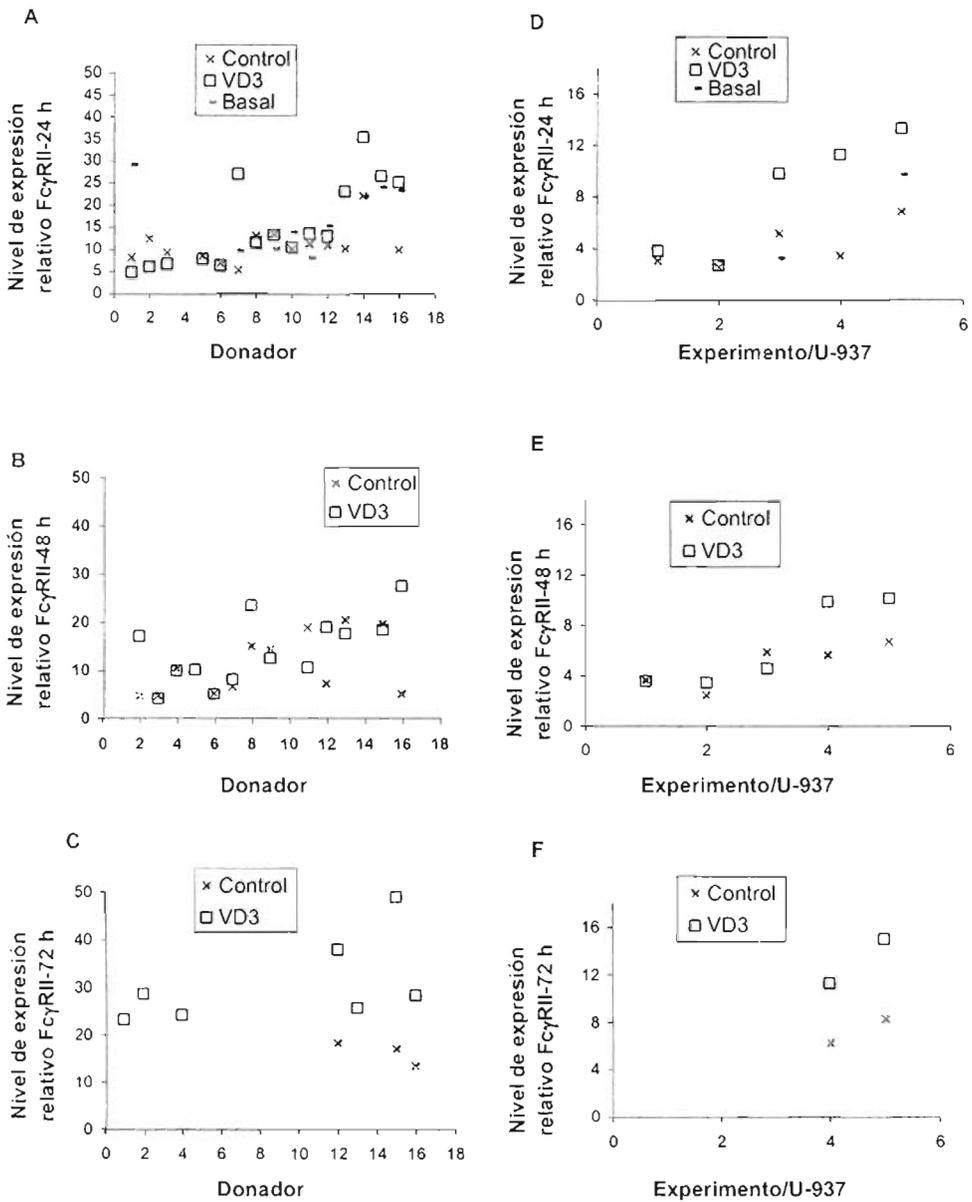


Fig. 5.2.6 Efecto de la VD3 en la expresión del Fc γ RII (CD32) en monocitos humanos de sangre periférica y la línea celular U-937. Los datos se grafican de manera individual, se muestra el nivel de expresión relativo a las 24 h en los monocitos humanos (A, N=16) y en las células U-937 (B, N=5) a las 48 h (B, N=16) (E, N=5) y 72 h (C, N=7) (F, N=2) de tratamiento con y sin la VD3. Estos datos son mostrados para cada donador, así como en la serie de experimentos con las células U-937.

Tabla 5.2.4 Efecto de la VD3 sobre la expresión del FcγRII (CD32) en monocitos humanos de sangre periférica y la línea U-937.

MONOCITOS HUMANOS							
	BASAL	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		Control	VD3	Control	VD3	Control	VD3
EXP	Nivel de expresión relativo						
1	29.08	8.05	4.71	N.D.	N.D.	N.D.	23.32
2	N.D.	12.32	6.01	4.68	17.08	N.D.	28.68
3	N.D.	9.19	6.58	4.65	4.15	N.D.	N.D.
4	N.D.	N.D.	N.D.	10.40	9.93	N.D.	24.22
5	N.D.	8.43	7.76	N.D.	10.13	N.D.	N.D.
6	7.23	6.83	6.35	5.16	5.05	N.D.	N.D.
7	9.68	5.33	26.99	6.58	8.04	N.D.	N.D.
8	10.33	13.04	11.59	15.03	23.49	N.D.	N.D.
9	10.13	13.49	13.22	14.27	12.45	N.D.	N.D.
10	13.77	10.22	10.53	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	8.17	11.34	13.61	18.83	10.52	N.D.	N.D.
12	15.30	10.99	12.95	7.26	18.91	18.32	37.94
13	N.D.	10.19	23.10	20.40	17.58	N.D.	25.71
14	21.94	22.08	35.45	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15	24.07	N.D.	26.49	19.66	18.37	17.12	48.96
16	23.28	9.85	25.16	5.08	27.54	13.42	28.36
\bar{x}	15.69	10.81	15.37	11.00	14.10	13.82	31.03
D.S.	7.54	3.97	9.58	6.29	7.05	5.35	9.27
U-937							
	BASAL	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		Control	VD3	Control	VD3	Control	VD3
EXP	Nivel de expresión relativo						
1	N.D.	3.04	3.80	3.66	3.59	N.D.	N.D.
2	3.05	2.57	2.69	2.47	3.48	N.D.	N.D.
3	3.25	5.17	9.82	5.89	4.58	N.D.	N.D.
4	N.D.	3.43	11.31	5.66	9.88	6.31	11.30
5	9.77	6.89	13.41	6.70	10.17	8.30	15.01
\bar{x}	5.36	4.22	8.21	4.88	6.34	7.31	13.15
D.S.	3.83	1.79	4.72	1.75	3.39	1.41	2.62

Se muestran en los monocitos humanos de sangre periférica y en las células U-937, el nivel de expresión relativo basal del FcγRII y a las 24, 48 y 72 horas en incubación con ó sin VD3; así como la media y la desviación estándar (D. S.). (N.D. No determinado)

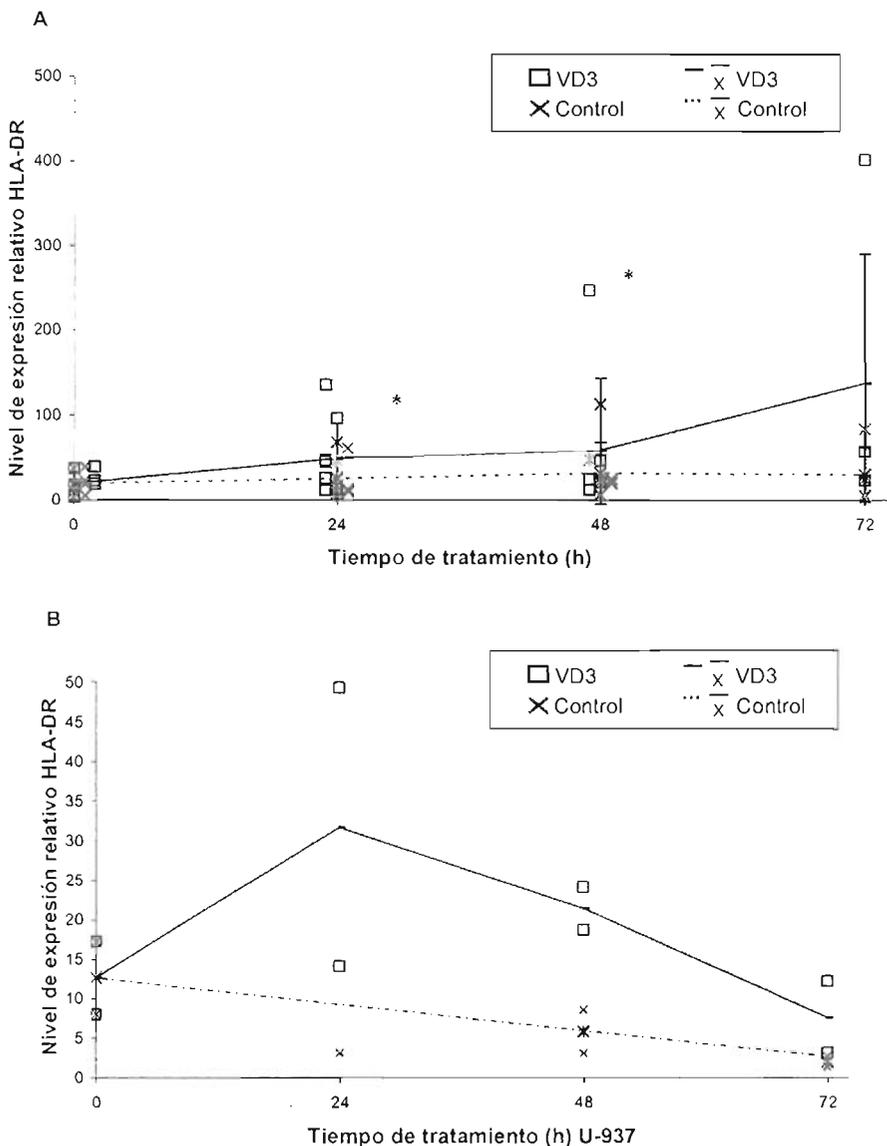


Fig. 5.2.7 Efecto de la VD3 sobre la expresión del HLA-DR en monocitos humanos de sangre periférica y la línea celular U-937. Se indica el nivel de expresión relativo del Fc γ RII en (A) monocitos humanos de sangre periférica y en (B) células U-937, a nivel basal y a los tiempos de 24, 48 y 72 h de tratamiento con y sin VD3. También se indica la media \pm D.S. de los valores del total de experimentos realizados al tiempo de tratamiento. *P<0.05 comparada con las células que no recibieron tratamiento.

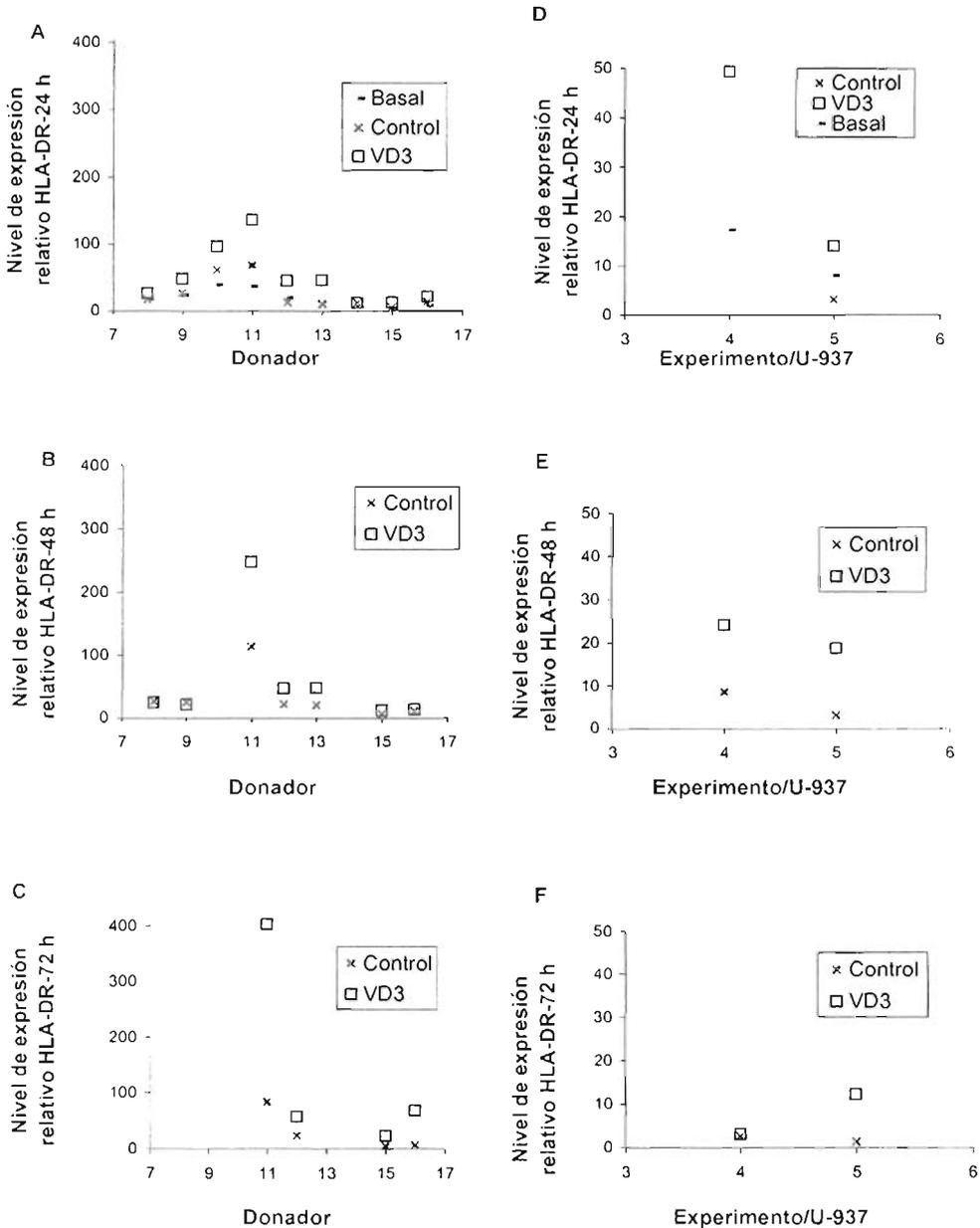


Fig. 5.2.8 Efecto de la VD3 en la expresión del HLA-DR en monocitos humanos de sangre periférica y la línea celular U-937. Los datos se grafican de manera individual, se muestra el nivel de expresión a las 24 h en los monocitos humanos (A, N=9) y en las células U-937 (D, N=2) a las 48 h (B, N=7) (E, N=2) y 72 h (C, N=4) (F, N=2) de tratamiento con y sin la VD₃. Estos datos son mostrados para cada donador, así como en la serie de experimentos con las células U-937.

Tabla 5.2.5 Efecto de la VD3 sobre la expresión del HLA-DR en monocitos humanos de sangre periférica y la línea U-937.

MONOCITOS HUMANOS							
	BASAL	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		S/VD3	C/VD3	S/VD3	C/VD3	S/VD3	C/VD3
<i>EXP</i>	Nivel de expresión relativo						
8	17.88	16.63	26.20	25.87	24.52	N.D.	N.D.
9	22.65	25.65	47.19	24.44	21.24	N.D.	N.D.
10	39.21	61.22	96.10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	37.26	68.46	135.74	113.25	247.98	83.39	402.49
12	18.92	12.41	45.35	21.57	46.65	23.64	57.30
13	N.D.	10.39	45.89	20.35	47.46	N.D.	N.D.
14	5.62	11.93	11.93	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15	3.53	5.62	12.89	6.50	12.12	5.12	23.22
16	8.54	13.38	21.61	11.06	13.68	6.87	68.33
\bar{x}	19.20	25.08	49.21	31.87	59.09	29.76	137.83
D.S.	13.54	23.25	41.41	36.58	84.52	31.80	153.70
U-937							
	BASAL	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		S/VD3	C/VD3	S/VD3	C/VD3	S/VD3	C/VD3
<i>EXP</i>	Nivel de expresión relativo						
4	N.D.	N.D.	49.37	8.65	24.22	2.63	3.10
5	8.02	3.16	14.15	3.12	18.77	1.39	12.22
\bar{x}	-----	-----	31.76	5.88	21.50	2.01	7.66
D.S.	-----	-----	24.91	3.91	3.86	0.88	6.45

Se muestran en los monocitos humanos de sangre periférica y en las células U-937, el nivel de expresión relativo basal HLA-DR y a las 24, 48 y 72 horas en incubación con ó sin VD3; así como la media y la desviación estándar (D. S.). (N.D. No determinado)

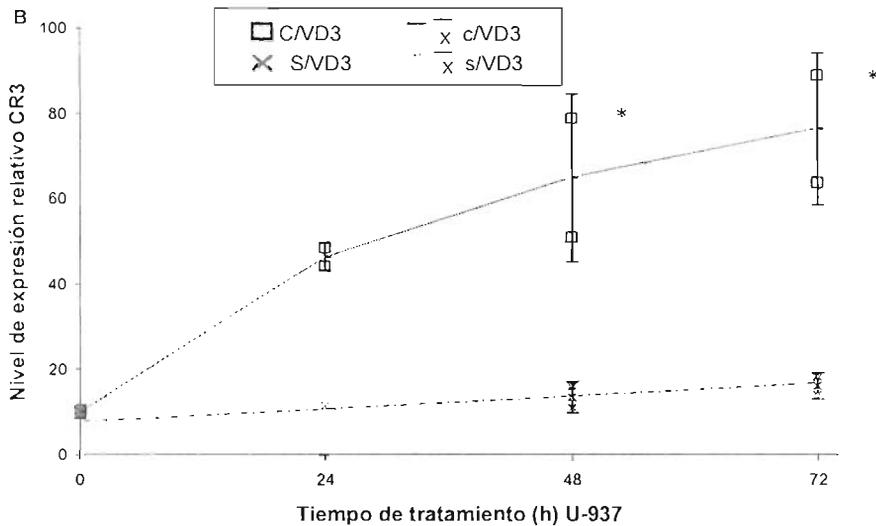
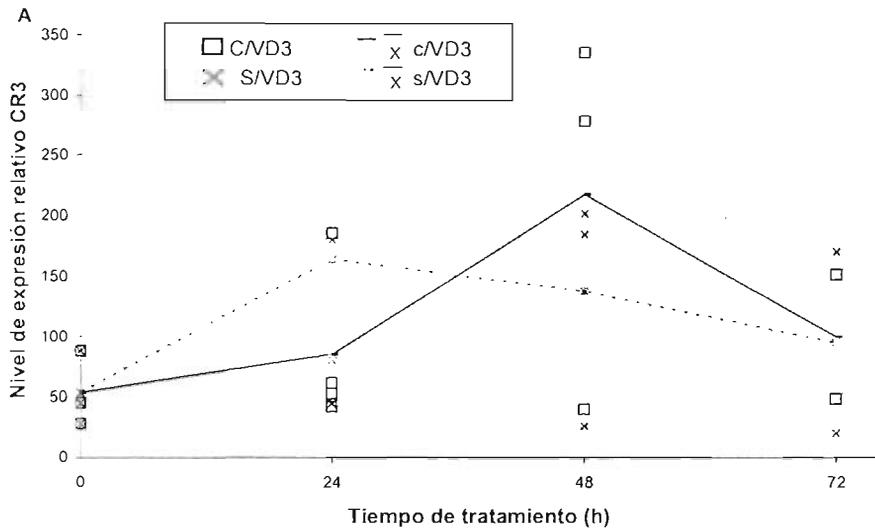


Fig. 5.2.9 Efecto de la VD3 sobre la expresión del CR3 evaluado en los monocitos humanos de sangre periférica y la línea U-937. Se muestra el nivel de expresión relativo para el CR3 en los monocitos humanos de sangre periférica a nivel basal y a los tiempos de 24, 48 y 72 h de tratamiento (A) con y sin VD3. En las células U-937 (B) se muestran los resultados en los tiempos de tratamiento indicados anteriormente. También se muestra la media \pm D.S. de los valores del total de experimentos realizados al tiempo de tratamiento. * $P < 0.05$ comparada con las células que no recibieron tratamiento.

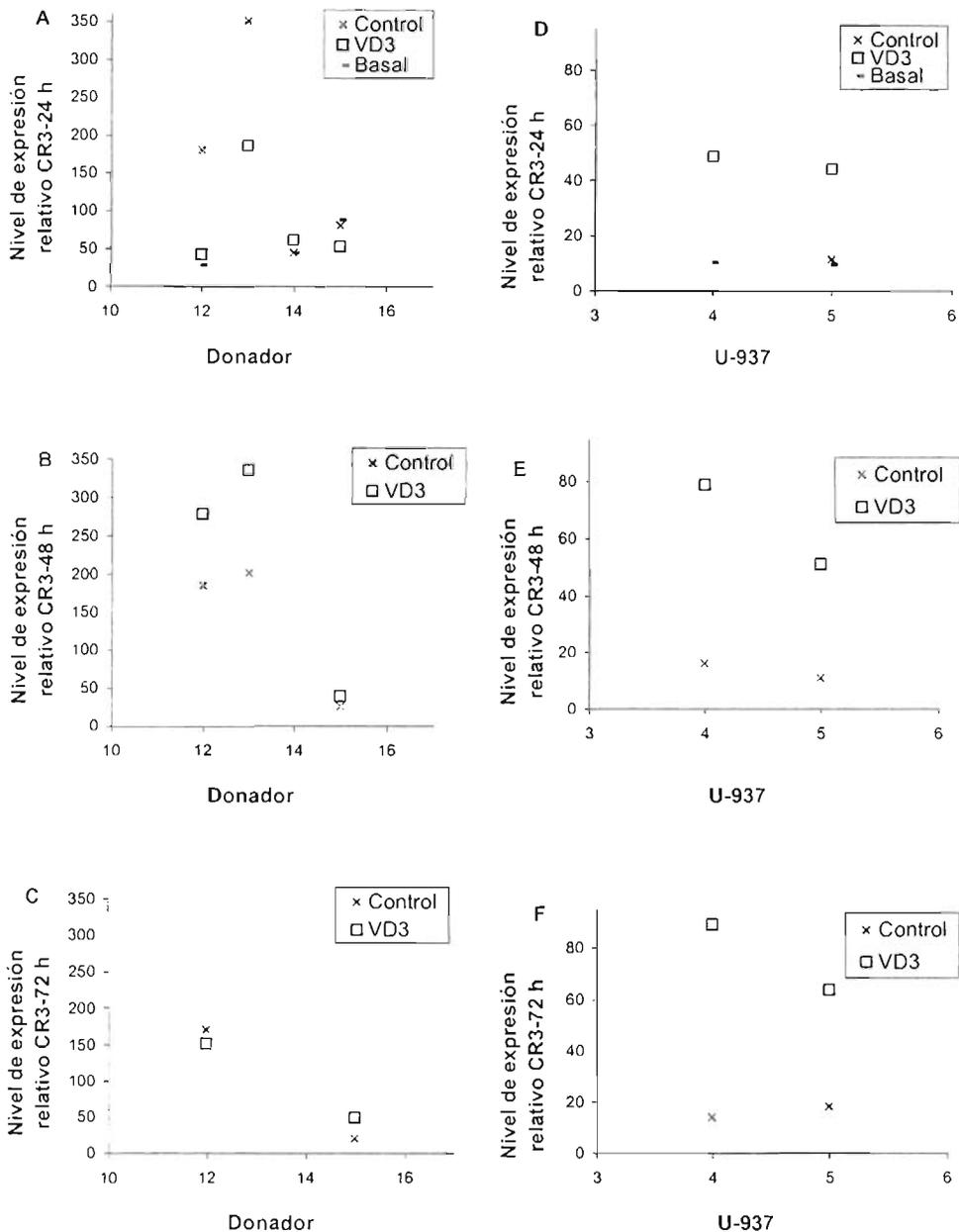


Fig. 5.2.10 Efecto de la VD3 sobre los monocitos humanos de sangre periférica y la línea U-937 en forma individual sobre la expresión del CR3. Se muestra el nivel de expresión relativo a las 24 h en los monocitos humanos (A, N=4) y en las células U-937 (B, N=2) a las 48 h (B, N=3) (E, N=2) y 72 h (C, N=2) (F, N=2) de tratamiento con y sin la VD3. Estos datos son mostrados para cada donador, así como en la serie de experimentos con las células U-937.

Tabla 5.2.6 Efecto de la VD3 sobre la expresión del CR3 en monocitos humanos de sangre periférica y la línea U-937.

MONOCITOS HUMANOS							
	BASAL	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		S/VD3	C/VD3	S/VD3	C/VD3	S/VD3	C/VD3
<i>EXP</i>							
12	28.12	180.67	42.19	185.31	278.94	171.34	152.45
13	N.D.	351.32	185.96	202.07	336.19	N.D.	N.D.
14	45.11	45.01	61.77	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
15	88.09	80.91	53.31	26.36	40.27	20.23	49.02
\bar{x}	53.78	164.48	85.81	137.91	218.46	95.79	100.74
d.s.	30.91	137.15	67.25	96.97	156.95	106.85	73.13
U-937							
	BASAL	24 HORAS		48 HORAS		72 HORAS	
		S/VD3	C/VD3	S/VD3	C/VD3	S/VD3	C/VD3
<i>EXP</i>							
4	10.32	N.D.	48.75	16.16	78.97	14.02	89.14
5	9.71	11.57	44.27	11.02	51.17	18.34	63.89
\bar{x}	10.01	-----	46.51	13.59	65.07	16.18	76.51
d.s.	0.43	-----	3.17	3.64	19.66	3.06	17.86

Se muestran en los monocitos humanos de sangre periférica y en las células U-937, el nivel de expresión relativo basal CR3 y a las 24, 48 y 72 horas en incubación con ó sin VD3; así como la media y la desviación estándar (D. S.). (N.D. No determinado)

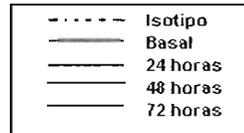
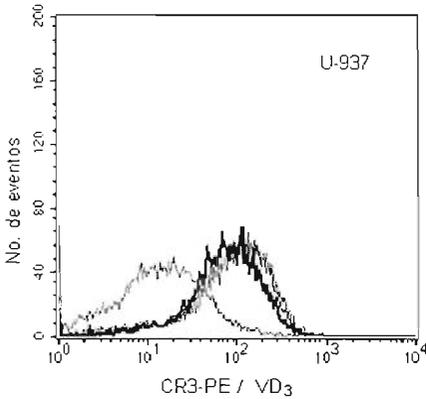
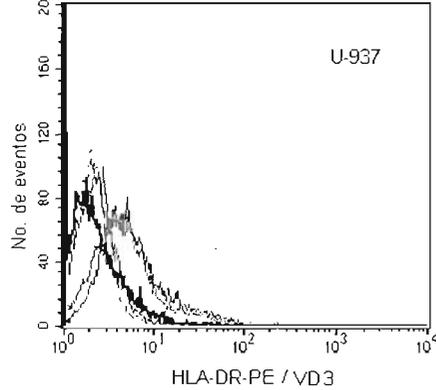
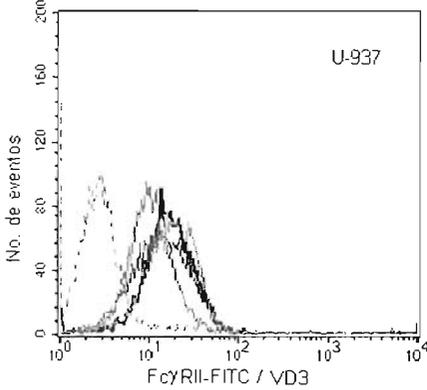
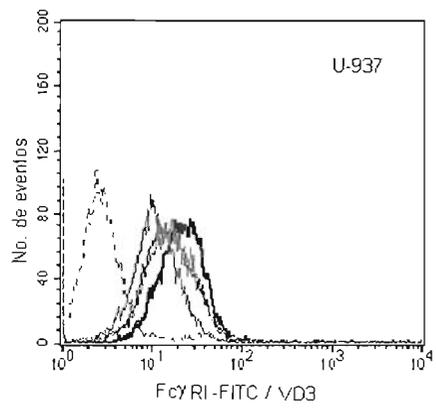
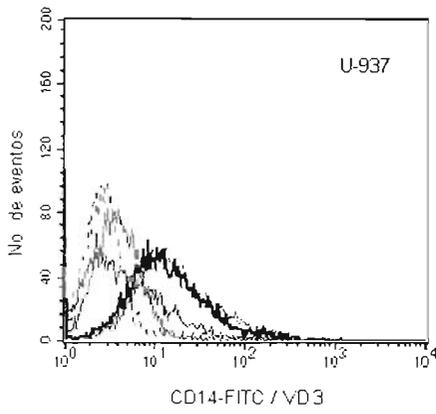


Fig. 5.3.11 Análisis de la citometría de flujo para los receptores CD14, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), HLA-DR y CR3 en las células U-937. Se muestran histogramas representativos de los receptores evaluados a los tiempos de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con VD3. Las preparaciones fueron lavadas y teñidas con IgG anti-ratón-FITC como anticuerpo secundario para los anticuerpos anti FcγRI y anti FcγRII e isotipos. El marcaje directo se realizó con los anti CD14-FITC/HLA-DR-PE y con el anti-CR3-PE. Después de la tinción las células fueron lavadas y fijadas. Se realizaron las compensaciones adecuadas, los eventos analizados como positivos se determinaron en base a la intensidad de fluorescencia de los controles de isotipo y a los niveles basales de expresión del receptor antes del tiempo de tratamiento.

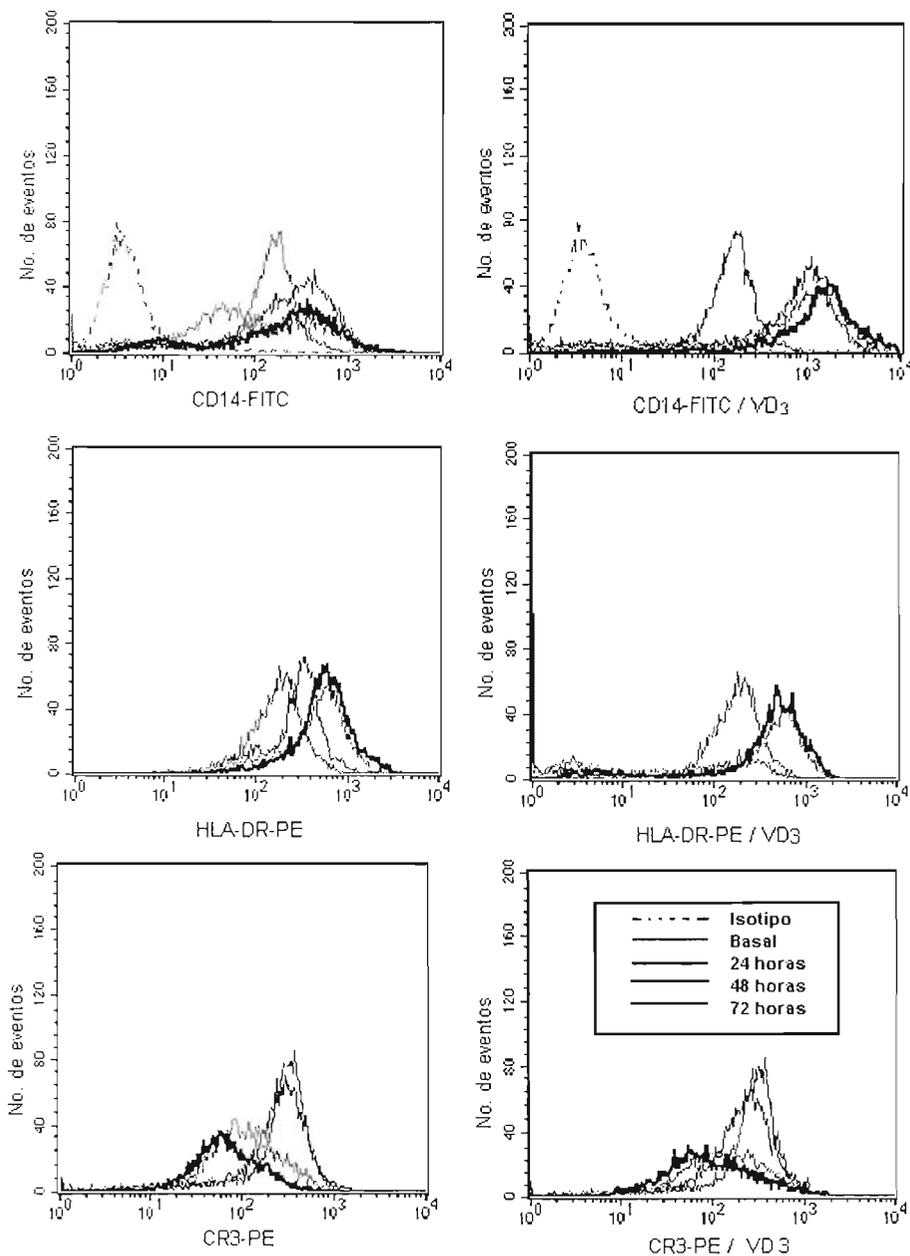


Fig. 5.3.12 Análisis de la citometría de flujo para los receptores CD14, HLA-DR y CR3 en los monocitos humanos de sangre periférica. Se muestran histogramas representativos de los receptores evaluados a los tiempos de 24, 48 y 72 horas con y sin tratamiento con VD3. El marcaje directo se realizó con los anti CD14-FITC/HLA-DR-PE y con el anti-CR3-PE. Después de la tinción las células fueron lavadas y fijadas. Se realizaron las compensaciones adecuadas, los eventos analizados como positivos se determinaron en base a la intensidad de fluorescencia de los controles de isotipo y a los niveles basales de expresión del receptor antes del tiempo de tratamiento.

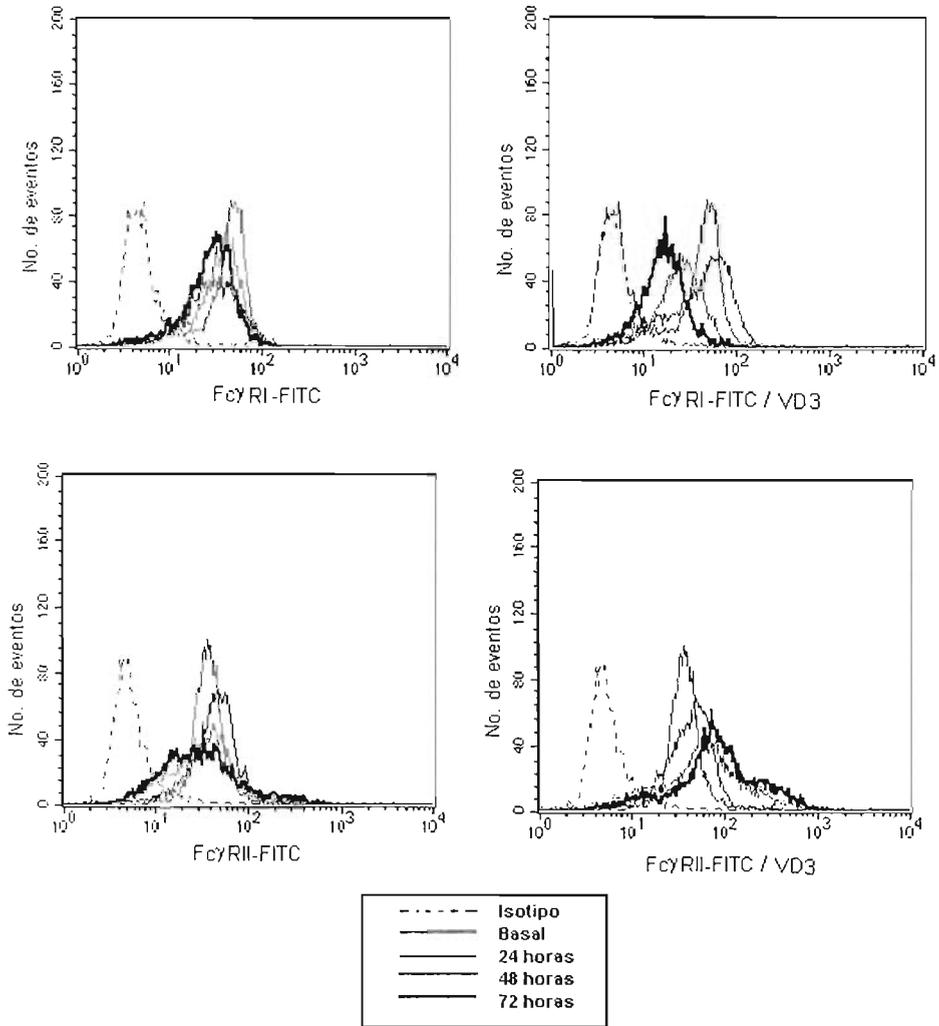


Fig. 5.3.13 Análisis de la citometría de flujo para los receptores FcγRI (CD64) y FcγRII (CD32) en los monocitos humanos de sangre periférica. Se muestran histogramas representativos de los receptores evaluados a los tiempos de 24, 48 y 72 horas con y sin tratamiento con VD3. Las preparaciones fueron lavadas y teñidas con IgG anti-ratón-FITC como anticuerpo secundario incluyendo isotipos. Después de la tinción las células fueron lavadas y fijadas. Se realizaron las compensaciones adecuadas, los eventos analizados como positivos se determinaron en base a la intensidad de fluorescencia de los controles de isotipo y a los niveles basales de expresión del receptor antes del tiempo de tratamiento.

5.3 EFECTO DE LA VD3 SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA

Las células fagocíticas constituyen una de las primeras líneas de defensa contra muchos microorganismos. Una de sus principales funciones efectoras es la fagocitosis.

Para evaluar la capacidad fagocítica de los monocitos de sangre periférica y de las células U-937 a los tiempos de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con VD3. Las células fueron incubadas por una hora a 37°C, en atmósfera con 10% CO₂ con eritrocitos opsonizados con anticuerpos monoclonales anti-DNP de los isotipos IgG1 e IgG2b. Después de transcurrido el tiempo de incubación con los eritrocitos, aquellos que no fueron internalizados se lisaron por choque hipotónico. Las células fueron examinadas por microscopía óptica en donde se observaron los eritrocitos ingeridos, se eligieron distintos campos para realizar el conteo y obtener de esta manera los índices fagocíticos (número de eritrocitos fagocitados o ingeridos por 100 células).

El protocolo que se tenía montado en el laboratorio para el ensayo de fagocitosis con las células U-937 no resultó adecuado para los monocitos de sangre periférica. Los monocitos no realizaban la fagocitosis al dejarlos hasta más de dos horas en incubación con los eritrocitos opsonizados. Por lo tanto se probaron distintas condiciones para el ensayo determinándose que era necesario incrementar los eritrocitos, condiciones que se mencionan en el protocolo de fagocitosis en la parte de metodología.

El tiempo de incubación reportado en el laboratorio²⁷ para la realización de la fagocitosis es de dos horas en las células U-937, pero en la cinética realizada con los monocitos humanos de sangre periférica, se observó que a este tiempo ya habían fagocitado demasiados eritrocitos (datos no mostrados), e incluso en algunas células no era posible realizar el conteo de una manera confiable. Para estas células se determinó que tras una hora de incubación era posible realizar el conteo de la fagocitosis de una manera adecuada.

Los experimentos de fagocitosis realizados con células aisladas de distintos donadores demostraron gran variabilidad en la capacidad fagocítica. Es posible que estas variaciones se deban a que se estaba evaluando en diferentes donadores con niveles basales fagocíticos diferentes y que respondían en mayor o en menor proporción al tratamiento con la VD3 (datos no mostrados). Por lo que se determinó realizar tres experimentos independientes con células de un solo donador. También se realizaron experimentos con las células U-937 bajo las mismas condiciones de tratamiento (Fig. 5.3.1 y 5.3.2).

De cada experimento se muestra la media \pm D.S. (desviación estándar) de los triplicados realizados. El nivel de significancia indicado se obtuvo mediante un análisis estadístico aplicando la prueba t de Student para dos muestras pareadas.

En la fagocitosis realizada con los eritrocitos de carnero opsonizados con IgG1 en las células U-937, el efecto sobre la capacidad fagocítica fue significativo

a las 48 horas de tratamiento en uno de los tres experimentos realizados. A las 72 horas de tratamiento con la VD3, el aumento en la capacidad fagocítica en los tres experimentos realizados fue significativo.

El efecto en la capacidad fagocítica a través de la IgG2b en las células U-937 fue significativo en dos de tres experimentos realizados a las 48 horas de tratamiento; y en los tres experimentos a las 72 horas de tratamiento. Los incrementos en la capacidad fagocítica fueron 4.8 veces mayor con la IgG1, y 15 veces mayor con la IgG2b a las 72 horas de tratamiento respecto al control en las células U-937

El efecto provocado por VD3 sobre la capacidad fagocítica en los monocitos humanos de sangre periférica no fue muy claro, aunque se realizaron tres experimentos de un solo donador. De los eritrocitos opsonizados con la IgG1 no se observan cambios en el índice fagocítico, salvo en uno de los tres experimentos realizados. En la fagocitosis usando eritrocitos opsonizados con la IgG2b no hubo diferencias significativas entre los monocitos tratados con VD3 y los monocitos no tratados, parece haber una disminución en el índice fagocítico conforme pasa el tiempo de incubación no importando si recibieron o no el tratamiento.

Tabla.5.3.1 Resumen del efecto de la fagocitosis mediada por IgG1 e IgG2b.

FAGOCITOSIS	Tiempo (horas)	MONOCITOS		U-937	
		No.A	p0.05	No. A.	p0.05
IgG1	24	≈	1.19	≈	1.43
	48	↑	1.68	↑	2.48
	72	↑	1.90	↑	4.98 *
IgG2b	24	≈	0.73	↑	3.92
	48	↑	2.03	↑	7.75 *
	72	↑	3.16	↑	15.87 *

Se muestra el número de veces que aumenta el índice fagocítico (No.A) en las células con VD3 respecto a las que no recibieron la VD3 al tiempo de tratamiento indicado. El aumento ↑, disminución ↓, y sin cambio ≈ en los índices fagocíticos está indicado. *P<0.05 comparada con las células que no recibieron tratamiento. Este dato es la división del índice fagocítico promedio al tiempo indicado con VD3 entre el índice fagocítico promedio de las células que no la recibieron.

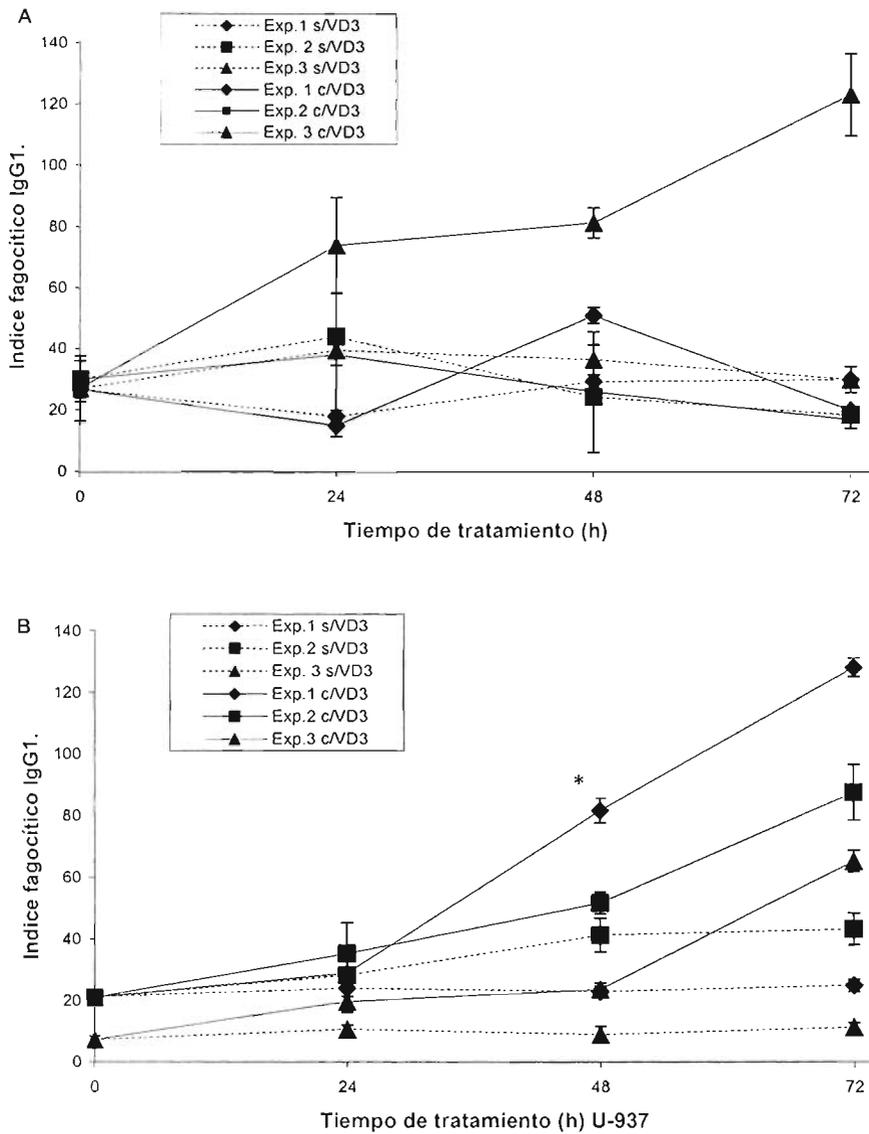


Fig. 5.3.1 Efecto de la VD3 sobre la capacidad fagocítica de los monocitos humanos de sangre periférica y las células U-937. Microscópicamente se determinó la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG1 a una concentración subhemaglutinante. Después de ser incubadas las células a los diferentes tiempos de tratamiento por 60 minutos con los eritrocitos, los no fagocitados se lisaron. Se muestra el promedio de los triplicados realizados \pm D.S. de cada experimento. * $P > 0.05$ comparada con las células que no recibieron tratamiento.

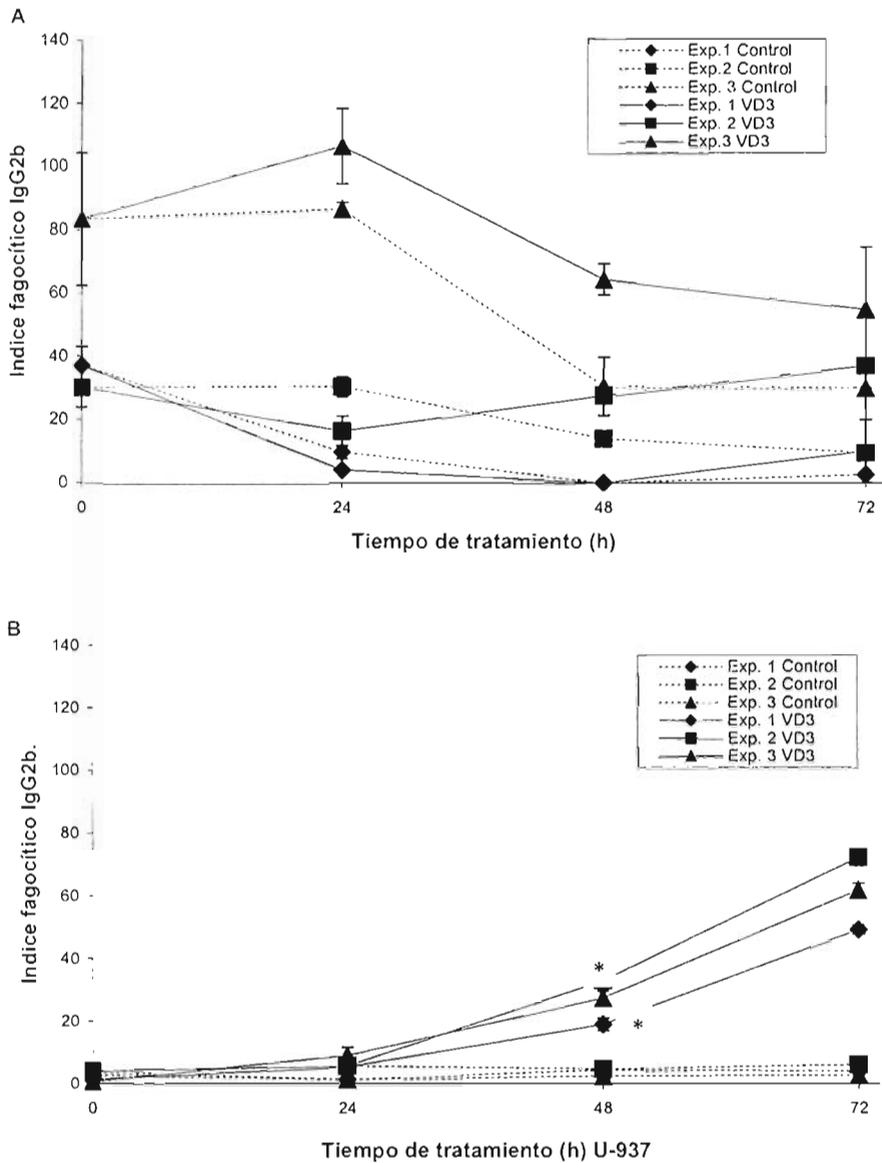


Fig. 5.3.2 Efecto de la VD3 sobre la capacidad fagocítica de los monocitos humanos de sangre periférica y las células U-937. Microscópicamente se determinó la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG2b a una concentración subhemaglutinante. Después de ser incubadas las células a los diferentes tiempos de tratamiento por 60 minutos con los eritrocitos, los no fagocitados se lisaron. Se muestra el promedio de los triplicados realizados \pm D.S. de cada experimento. * $P > 0.05$ comparada con las células que no recibieron tratamiento.

Tabla 5.3.1 Efecto de la VD3 sobre la capacidad fagocítica de los monocitos humanos de sangre periférica y las células U-937 en eritrocitos opsonizados con IgG1.

MONOCITOS													
Tiempo horas	1				2				3				
	Control		VD3		Control		VD3		Control		VD3		
	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	
0	26.67 ± 4.04				30.00 ± 6.08				27.00 ± 10.58				
24	18.00 ± 2.00		15.00 ± 3.61		44.00 ± 6.56		38.00 ± 20.22		39.50 ± 4.95		74.00 ± 15.56		
48	29.33 ± 2.08		51.00 ± 2.65		24.33 ± 7.51		26.00 ± 19.70		36.50 ± 4.95		81.50 ± 4.95		
72	30.00 ± 4.24		20.00 ± 0.00		18.50 ± 0.71		17.00 ± 2.83		30.00 ± 0.00		123.50 ± 13.44		

U-937													
Tiempo horas	1				2				3				
	Control		VD3		Control		VD3		Control		VD3		
	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	\bar{x}	D.S	
0	21.33 ± 1.00				21.00 ± 1.73				7.33 ± 1.15				
24	24.00 ± 2.65		29.00 ± 5.20		28.33 ± 1.53		35.33 ± 10.02		10.67 ± 1.53		19.67 ± 3.51		
48	23.00 ± 1.73		81.67 ± 4.04		41.33 ± 5.51		51.67 ± 3.51		9.00 ± 2.65		23.67 ± 2.08		
72	25.00 ± 2.00		128.33 ± 3.06		21.67 ± 2.52		87.67 ± 9.07		11.33 ± 1.53		65.33 ± 3.51		

Se realizaron tres experimentos independientes con células obtenidas de un mismo donador, cada experimento se realizó por triplicado, de los índices fagocíticos promedio obtenidos se obtuvo la media y la D.S También se realizaron de manera análoga experimentos con las células U-937.

Tabla 5.3.2 Efecto de la VD3 sobre la capacidad fagocítica de los monocitos humanos de sangre periférica y las células U-937 en eritrocitos opsonizados con IgG2b.

MONOCITOS													
Tiempo horas	1				2				3				
	Control		VD3		Control		VD3		Control		VD3		
	\bar{x}	D.S											
0	37.00	± 6.00			30.00	± 6.08			83.33	±20.98			
24	9.67	± 2.08	4.00	± 1.00	30.33	± 3.21	16.33	± 4.73	86.50	± 2.12	106.50	±12.02	
48	0	----	0	----	14.00	± 0.00	27.50	± 2.12	30.50	± 9.19	64.50	± 4.95	
72	2.67	± 0.00	10.00	± 9.90	9.50	± 0.71	37.00	±16.97	30.00	----	55.00	±19.80	

U-937													
Tiempo horas	1				2				3				
	Control		VD3		Control		VD3		Control		VD3		
	\bar{x}	D.S											
0	2.67	± 0.58			4.00	± 1.00			3.67	± 0.58			
24	1.33	± 1.15	5.33	± 1.53	5.67	± 1.53	5.67	± 2.31	1.33	± 0.58	9.00	± 2.65	
48	4.33	± 1.15	19.00	± 2.00	4.67	± 2.08	33.00	± 6.56	2.33	± 0.58	27.50	± 2.12	
72	4.00	± 1.00	49.33	± 1.53	6.00	± 1.73	72.33	± 2.08	2.67	± 0.58	62.00	± 2.00	

Se realizaron tres experimentos independientes con células obtenidas de un mismo donador, cada experimento se realizó por triplicado, de los índices fagocíticos promedio obtenidos se obtuvo la media y la D.S. También se realizaron de manera análoga experimentos con las células U-937.

CAPITULO 6

DISCUSIÓN

Las células del sistema fagocítico mononuclear llevan a cabo un complejo proceso de maduración, el cual ocurre a través de diferentes rutas gobernadas por diversos factores microambientales. *In vivo*, la diferenciación de los monocitos produce distintas poblaciones celulares. Diversos agentes, incluyendo la vitamina D3, han mostrado ser inductores de diferenciación *in vitro*, produciendo cambios en líneas celulares monocíticas, induciéndolas a adquirir características fenotípicas de macrófagos.⁴¹

Los receptores de membrana para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (Fc γ R), son una familia de moléculas expresadas en muchos leucocitos. La agregación de estos receptores por complejos de antígeno-anticuerpo conduce a diversas respuestas como la fagocitosis, incremento en la producción y secreción de moléculas proinflamatorias, producción de citocinas y citotoxicidad celular mediada por anticuerpos.

La vitamina D3, como hormona esteroide, modula el crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares. Este efecto es mediado por su unión a un receptor intracelular, el cual interactúa, bajo la acción de la hormona, con secuencias definidas de genes para activar o reprimir su transcripción. Entre los genes que controla la VD3 se encuentran los que regulan la proliferación y diferenciación celular, los que controlan la síntesis de citocinas, factores de crecimiento, etc.²⁶

El objetivo de este trabajo fue establecer y caracterizar la diferenciación *in vitro* inducida por VD3 en monocitos humanos de sangre periférica, para estudiar posibles diferencias y similitudes con la diferenciación causada por VD3 en células U-937.

El proceso de diferenciación conlleva cambios fenotípicos como: pérdida de la división mitótica, maduración celular e incremento de la actividad funcional de células maduras. Entre los cambios más utilizados como criterio de diferenciación en células mieloides están: disminución de la proliferación celular, adherencia al plástico, actividad de esterasas no específicas y aumento en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ATCC). *In vivo*, los monocitos migran a los tejidos donde son estimulados por diversas moléculas del microambiente tisular pasando por diversos estadios de diferenciación hasta alcanzar la madurez de

sus capacidades funcionales. Algunos de estos cambios son equiparables con los cambios que se pueden inducir *in vitro* en líneas celulares.

Nosotros demostramos que *in vitro*, la VD3 induce en monocitos humanos un aumento en su tamaño y extensión celular y en su adherencia al plástico. Estos cambios son similares a los observados en células de la línea monolítica U-937. Los cambios observados en las células U-937 corroboran los reportados en el laboratorio por C. Hallal, en donde al tratar células U-937 con VD3 observó mayor adherencia y disminución de la proliferación celular.²⁷ Estos cambios indican que VD3 indujo un proceso de diferenciación en los monocitos humanos. Ahora bien, si se sabe que durante el proceso de diferenciación de los monocitos hay un cambio en la expresión de diversos antígenos de superficie importantes para el control y ejecución de diferentes funciones⁵; entonces otra manera de demostrar que los monocitos que se trataron con VD3 entraron en un proceso de diferenciación, es la evaluación de la expresión de algunos de estos receptores; como CD14, FcγRI, FcγRII, CR3 y HLA-DR.

La expresión del CD14 aumenta durante el tratamiento con VD3 en células U-937 y en monocitos humanos de sangre periférica. Estos datos corroboran los reportados.⁴³ La VD3 es un importante modulador de la adhesión celular⁶⁶, lo cual concuerda con el aumento en la expresión del CD14 y en la adherencia a la superficie de plástico observada. *In vivo* el CD14 es una molécula que media la respuesta al LPS durante una infección bacteriana, proceso en el cual hay diferenciación/activación de las células monocíticas, también participa en la adhesión durante la interacción de los monocitos-células endoteliales durante la inflamación⁴³. Los FcγR's y el CR3 median fagocitosis en células que expresan estos receptores, como los monocitos humanos de sangre periférica y en las células U-937. La fagocitosis y la expresión de estos receptores pueden estar relacionadas con el estado de diferenciación de la célula. Una manera de estudiar una posible correlación entre la capacidad fagocítica y el estado de diferenciación es evaluando la expresión de estos receptores y la fagocitosis. Por esto uno de nuestros objetivos fue evaluar la fagocitosis mediada por los receptores FcγRI y FcγRII en monocitos humanos de sangre periférica durante el proceso de diferenciación.

La VD3 en los monocitos humanos de sangre periférica no tuvo efectos significativos sobre la expresión del receptor FcγRI; en la expresión del FcγRII tuvo un ligero efecto positivo hasta las 72 horas en cultivo con VD3. En las células U-937 la expresión del FcγRI no cambio significativamente, el FcγRII si mostró un aumento significativo de casi dos veces a las 24 y 72 horas de tratamiento.

La expresión del CR3 no cambió significativamente en los monocitos humanos, mientras que en las células U-937 el tratamiento con VD3 aumentó significativamente su expresión casi 5 veces. Los aumentos en la expresión del CR3 en las células U-937 son consistentes con los reportados.^{27, 56}

En los monocitos humanos de sangre periférica la VD3 indujo un ligero aumento en la fagocitosis mediada por los receptores Fc γ RI y Fc γ RII; sin embargo este aumento no tuvo significancia estadística. En células U-937 la fagocitosis mediada por IgG1 tuvo un aumento significativo de hasta 5 veces al tiempo final de tratamiento, para la fagocitosis mediada por la IgG2b el aumento fue de hasta 15 veces.

Los datos obtenidos en las células U-937 demuestran que la VD3 induce un incremento en la fagocitosis mediada por los receptores Fc γ RI y Fc γ RII, el cual no está ligado a un aumento significativo en la expresión de los mismos. Estos datos son consistentes con los reportados en nuestro laboratorio por C. Hallal. Ahora bien, en los monocitos humanos de sangre periférica no sucede lo mismo, ya que la expresión de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII no cambió para el primero y para el segundo tuvo un ligero aumento significativo hasta las 72 horas de tratamiento, y la fagocitosis mediada por los mismos sólo tiene ligeras diferencias que no son significativas. Podemos decir que en esas muestras bajo las condiciones experimentales la VD3 no está ejerciendo efectos significativos sobre la expresión y la fagocitosis mediada por los receptores Fc γ RI y Fc γ RII en los monocitos humanos de sangre periférica. No obstante es importante considerar que de los experimentos realizados, al tiempo de 72 horas no se obtuvieron replicados suficientes para poder concluir de una forma clara sobre los cambios observados en el nivel de expresión de los receptores de membrana evaluados al final de tratamiento.

Los resultados de fagocitosis no permitieron llegar a conclusiones sólidas, ya que para cada tiempo de tratamiento se observaron aumentos o disminuciones en la fagocitosis que no permitieron determinar si la VD3 tuvo un efecto sobre la capacidad fagocítica de monocitos humanos. Una posible explicación de estas variaciones es el hecho de que estábamos usando monocitos humanos aislados de diferentes donadores, y cada donador presentó distintos niveles basales de expresión de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII; así como capacidades fagocíticas diferentes, por lo cual la VD3 podría estar ejerciendo un mayor o menor efecto. Para poder descartar esta posibilidad, se realizaron los ensayos de fagocitosis con células de un mismo donador, los cuales son los mostrados. Aún así no se observa efecto de la VD3 sobre la fagocitosis. Estos resultados podrían deberse a que estas células son monocitos humanos normales, y las células U-937 son células monocíticas provenientes de un mieloma.

Finalmente debemos considerar que hay datos reportados sobre fagocitosis en monocitos humanos distintos, ya que por una parte demuestran que VD3 disminuye la expresión de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII, así como la capacidad fagocítica en los monocitos humanos durante 7 días de tratamiento; en otro se muestra que monocitos humanos de sangre periférica en cultivo sin ningún estímulo, aumentan su capacidad fagocítica⁵⁴, mientras que en otros reportes se encontró que disminuye²⁸ o que es variable.³⁷ En células U-937, donde se reporta que hay un aumento en la expresión (aunque no fueron significativos), pero que

conuerdan con los datos que se obtuvieron.⁵⁶ Estas discrepancias subrayan la gran variabilidad que puede existir en poblaciones de células aisladas de individuos distintos, aunado a que se usaron diferentes técnicas de aislamiento y que estas pueden activar en diferente forma a los monocitos, el método usado por nosotros activa en menor grado²³ a los monocitos humanos.

Los datos obtenidos con las células U-937 son consistentes con los reportados por C. Hallal en donde se indujo un aumento en la fagocitosis por las células U-937 tratadas con VD3²⁷, y en el cual el gran aumento en la capacidad fagocítica relacionado con el poco aumento en la expresión de los receptores Fc γ RI y Fc γ RII demuestra que la fagocitosis depende no sólo de la cantidad de receptores agregados por el estímulo, sino que también es altamente dependiente del estado de diferenciación de la célula.

En cuanto a la especificidad por la IgG es interesante que la fagocitosis de glóbulos rojos opsonizados con IgG1 o IgG2b fuera afectada de manera diferente por la diferenciación en las células U-937. Se observó que fue mayor la fagocitosis de los eritrocitos opsonizados con IgG2b a las 72 horas de tratamiento (el incremento fue 3 veces mayor que el observado por la fagocitosis mediada IgG1), aunque inicialmente; es decir, a nivel basal la fagocitosis fue mucho mayor en los eritrocitos opsonizados con IgG1. En los monocitos humanos fue ligeramente mayor la fagocitosis mediada por la IgG2b que la mediada por IgG1, aunque la diferencia no es significativa. Una posible explicación de estos efectos podría ser que a nivel de señalización bioquímica resultante de la agregación de los receptores estén participando moléculas de señalización en forma diferente debido al estado de diferenciación de la célula.

No se observaron cambios significativos en el nivel de expresión del HLA-DR y CR3 en los monocitos humanos de sangre periférica ni en las células U-937, ya que sólo se trabajo por duplicado y no son suficientes concluir. Se ha reportado que la VD3 disminuye el nivel de los tres alelos principales del MHC-II (HLADR, DP y DQ) y que la expresión del CR3 llega a aumentar.

Durante el curso de la respuesta inflamatoria es esencial una eficiente unión y eliminación de microorganismos opsonizados, en la cual participan los receptores Fc γ R y el receptor del complemento. La VD3 modula la fagocitosis y la expresión del CR3 en células U-937, pero parece no hacerlo en los monocitos humanos de sangre periférica. En menor grado parece hacerlo sobre la expresión de los receptores Fc en las células U-937, pero no en los monocitos humanos. Nuestros resultados muestran que la fagocitosis de los eritrocitos opsonizados con las inmunoglobulinas de las subclases IgG1 y e IgG2b es diferente en los monocitos humanos de sangre periférica y en las células de la línea U-937. En este sentido, es interesante notar que la fagocitosis basal de las U-937 es más baja que en los monocitos.

La activación de los macrófagos ocurre de manera rápida, sobre todo en el desarrollo de muchas lesiones patológicas incluyendo tumores malignos, formación de placas ateroscleróticas, artritis juvenil, diabetes, enfermedad

granulomatosa crónica, lupus eritematoso e infección por VIH. La progresión de algunas de estas enfermedades ocurre principalmente por la producción de mediadores proinflamatorios, así como por el resultado de la capacidad de los macrófagos de actuar como hospederos y reservorios de muchos patógenos.

Muchos de los eventos regulatorios de la función de macrófagos no han sido del todo identificados. Se sabe que la VD3 modula la expresión de citocinas de una manera dependiente del tiempo y concentración; en base a esto se ha sugerido que derivados no hipercalcemicos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pueden ser usados para terapias inmunosupresoras. También se ha mostrado que VD3 es regulador directo de la respuesta antimicrobiana en la respuesta inmune innata, ya que induce un incremento en la producción de proteínas antimicrobianas, sugiriendo el uso potencial de sus análogos en el tratamiento contra infecciones por microorganismos oportunistas. In vivo, la diferenciación de monocitos a macrófagos esta asociada con un incremento en la capacidad celular para oxidar LDL, el cual puede representar un mecanismo protector para remover el LDL aterogénico del espacio extracelular en las paredes arteriales.

Por tanto es importante continuar el estudio y caracterización de los efectos de la VD3 y otros agentes diferenciadores sobre células mieloides, las cuales cumplen funciones importantes en los mecanismos de defensa.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

El tratamiento con VD3 en monocitos humanos de sangre periférica indujo su diferenciación *in vitro* resultando en la obtención de poblaciones celulares con características morfológicas diferentes a las células que no recibieron el tratamiento. Estas poblaciones adquirieron características del fenotipo macrófago, los cambios que se manifestaron principalmente fueron un aumento en la expresión del CD14, adherencia y tamaño celular, cambios sugerentes de que se esta llevando a cabo un proceso de diferenciación.

Como respuesta funcional de las células tratadas se determinó la fagocitosis. La VD3 sólo incremento la capacidad fagocítica en las células U-937, pero no en los monocitos de sangre periférica, indicando que las células del linaje monocito/macrófago pueden tener diversas respuestas al mismo agente. Esto puede explicarse ya sea por los distintos estadios que representa la célula, o bien considerando que los monocitos humanos son células normales y que la línea celular U-937 proviene de una leucemia mieloide en la cual las células tienen modificaciones en la expresión y en la regulación de algunos genes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, D., Hamilton, T., (1984). The cell biology activation of macrophage activation. *Annu Rev. Immunol* 283-295.
2. Aderem, A., Underhill, M., (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593-623
3. Agramonte, H. J., Hallal, C., Garay, C. C., Guerra, A. C., Camacho, A. I., Ortega, S. E., (2003). 1α , 25-Dihydroxy-Vitamin D₃ Alters Syk activation through Fc γ RII in monocytic THP-1 Cells. *J. Cell. Biochem.* 89:1056-1076.
4. Ancuta, P. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16 monocytes. *J. Exp. Med.* 197:1701-1707.
5. Bhatia, M., Kirkland, J.B., Kelly, A., Meckling, G., (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Primes Acute Promyelocytic Cells for TPA-induced Monocytic Differentiation through Both PKC and Tyrosine Phosphorylation Cascades. *Exp. Cell Res.*, 222:61-69.
6. Bhatia, M, Kirkland, J.B., Meckling, G., (1995). Monocyte differentiation of Acute Promyelocytic Leukemia Cells in response to 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Is Independent of Nuclear Receptor Binding. *J. Biol. Chem.*, 270-27:15962-15965.
7. Bellingan, G., (2002). Adhesión molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation. *J. Exp. Med.* 196:1515-1521.
8. Bogdan, C., (2001). Macrophages. *Encyclopedia of life sciences*, 1-9.
9. Bogdan, C., Nathan, C., (1993). Modulation of macrophage function by transforming growth factor- β , interleukin 4 and interleukine 10. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 685: 245-252.
10. Boltz-Nitulesco, G., Willheim, M., Spittler, A., Leutmezer, F., Temfer, C., Winkler, S., (1995). Modulation of IgA, IgE, and IgG Fc receptor expression on human mononuclear phagocytes by 1α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and citokines. *J. Leukoc. Biol.*, 58:256-262.
11. Buling, F., Ittenson, A., Kaiser, D., Tholert, G., Hoffmann, B., Reinhold, D., Ansorge, S., Welte, T., (2000) MRP8/MRP14, CD11b and HLA-DR expression of alveolar macrophages in pneumonia. *Immunol. Lett.*, 71-3:185-190.
12. Castellanos, M., Guevara, R., Robinson, R., Vázquez, R., (2000). Respuestas inmunes innata y adaptativa. *Medisan* 2000 4:64-74.
13. Cox, D., Greenberg, S., (2001). Phagocytic signaling strategies: Fc γ receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Immunology* 13:339-345.
14. Daëron, M., (1997). Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234.
15. Douglas, S. D., Hassan, N. F., (1990). Morphology of monocytes and macrophages. Hematology (4th edn), (ed. Williams, W. J., Beutler, E., Erslev A. J., and Lichtman M.A.) Mc Graw Hill, New York.
16. Eelen, G., Verlinden, L., van Camp, M., van Hummelen, L., Marchal, K., de Moor, B., Mathieu, C., Carmeliet, G., Bouillon, R., Verstuyf, A., (2004). The effects of 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on the expression of DNA replication genes. *J. Bone Miner. Res.*, 19-1:133-146.

17. **Edberg, C., Kimberly, P.**, (1992). Receptor specific probes for the study of Fc γ receptor specific function. *Journal of Immunological Methods* 148:179-187.
18. **Fearon, D., Locckey, R.**, (1996). The instinctive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-53.
19. **Fernández, N., Renedo, M., Alonso, S., Sánchez C.M.**, (2003). Release of Arachidonic Acid by Stimulation of Opsonic Receptors in Human Monocytes. *J. Biol. Chem.* 278-52:52179-52187.
20. **Fuhrman B, Shiner M, Volkova N, Aviram M.**, (2004) Cell-induced copper ion-mediated low density lipoprotein oxidation increases during in vivo monocyte-to-macrophage differentiation. *Free Radic Biol Med.* 2004 Jul 15;37(2):259-71.
21. **Gerztein, R.**, (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 398:718-723.
22. **Gillooly, J., Simonsen, A., Stenmark, H.**, (2001). Phosphoinositides and phagocytosis. *J. Cell.Biol.*, 155-1:15-17.
23. **Graziani-Bowering, G.M., Graham, M.J., Filion, L.G.**, (1997). A quick, easy and inexpensive method for the isolation of human peripheral blood monocytes. *The Journal of Immunological Methods*, 207:157-158.
24. **Grignaschi, V. J.**, (1991). Diagnóstico citológico de las hemopatías. (Ed. Medica Panamericana) España, 169-170, 181,186.
25. **Guha, M., Mackman, N.**, (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signaling*, 13:85-94.
26. **Gurlek, A., Pittelkow, M.R., Kumar, R.**, (2002). Modulation of Growth factor/Cytokine Synthesis and Signaling by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D $_3$: Implications in Cell Growth and Differentiation. *Endocrine Reviews*, 23:763-786.
27. **Hallal-Calleros, C., Agramonte H. J., Garay C. C., Oliver M. J., Guerra A. C., Heras D., Camacho A. I., Soto C. I., Ortega E.** (2005) Syk and Lyn phosphorylation induced by Fc γ RI and Fc γ RII crosslinking is determined by the differentiation state of U-937 monocytic cells. *Immunology letters*, en prensa.
28. **Harris, E. P., Ralph, P., Litcofsky, P., Moore, M.A.M.**, (1985). Distinct Activities of Interferon- γ , Lymphokine and Cytokine Differentiation-inducing Factors Acting on the Human Monoblastic Leukemia Cell Line U937. *Cancer Research*, 45:9-13.
29. **Harrison, E., Grinstein, S.**, (2002). Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton. *Biochem Cell. Biol.*, 80:509-515.
30. **Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, MG., Silver, R. and Goyet SM.**, (1988). The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* 141:547 pages faltan
31. **Hewinson, M., Freeman, L., Hughes, V., Evans, N., Bland, R., Eliopoulos, G., Kilby, D., Moss, H., Chakraverty, R.**, (2003). Differential Regulation of Vitamin D Receptor and Its ligand in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 170:5382-5390.
32. **Hodgson, S., Dunn, R.**, (2001). Bone Marrow. *Encyclopedia of life sciences*, 1-10.

33. **Imhof, B. A., Aurrans-Lions, M.,** (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature* 4:432-444
34. **Imhof, B.A., Dunon, D.,** (1995). Leucocyte migration and adhesion. *Adv. Immunol.*, 58:345-416.
35. **Janeway, Ch., Travers, P.,** (1989). Host defense against infection. *Immunology* 9:1-9.
36. **Jungi, W. T., Hafner, S.,** (1986). Quantitative assessment of Fc receptor expression and function during *in vitro* differentiation of human monocytes macrophages. *Immunology*, 58:131-137.
37. **Kurth, I.,** (2001). Monocyte selectivity and tissue localization suggests a role for breast and kidney-expressed chemokine (BRAK) in macrophage development. *J. Exp. Med.*, 855–861 (2001).
38. **Lemon, D., Fondell, D., Freedman, P.,** (1997). Retinoid X receptor: vitamin D3 receptor heterodimers promote stable preinitiation complex formation and direct 1,25-dihydroxyvitamin D3-dependent cell-free transcription. *Mol Cell. Biol.*, 17-4.
39. **Martinez L. B.** (2002) Caracterización de cambios fenotípicos y funcionales en células de linaje mielomonocítico en diferentes estadios de diferenciación. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
40. **Medzhitov, R., Janeway, Ch.,** (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173:89-97.
41. **Meuret, G., Hoffmann, G.,** (1973). Monocyte kinetic studies in normal and disease states. *Br. J. Haematol* 24:275.
42. **Monkawa, T., Yoshida, T., Hayashi, M., Saruta, T.,** (2000). Identification of 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene expression in macrophages. *Kidney international*, 58:559-568.
43. **Öberg, A., Botling, J., Nilsson, K.,** (1993). Functional Antagonism between Vitamin D₃ and Retinoic Acid in the regulation of CD14 and CD23 Expression during Monocytic Differentiation of U-937 Cells. *Journal of Immunology* 150:3487-3495
44. **Penn, J. D.,** (2001). Major Histocompatibility Complex: Human. *Encyclopedia of life sciences*, 1-6.
45. **Rigby, W., Waugh, M., Graziano, R.,** (1990). Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Blood*, 76-1:189-197. este es el ke puse
46. **Rogler, G., Hausmann, D., Vogl, E., et al,** (1998). Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 112: 205-215
47. **Rojas, E.,** (1997). Bioquímica de la fagocitosis: una breve revisión. *Bioquímica*, 22-1(86):612-634.
48. **Rothlein, R., Springer T. A.,** (1985). Complement receptor type three-dependent degradation of opsonized erythrocytes by mouse macrophages. *J. Immunol.*, 135-4:2668-2680.
49. **Rouzant, A., López, M., de Miguel, C.,** (2000). Differential Gene Expression in the Activation and Maturation of Human Monocytes. *Biochemistry and Biophysics* 374-2:153-160.

50. Ruppert, J., Friedrichs, D., Xu, H., Peters, Jh., (1991). IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency. *Immunology*, 182-5:4449-464.
51. Sánchez, M., Rosales, C., (1998). Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J. Leukoc. Biol.* 63:521-533.
52. Scherberich, J., Nockher, W., (1999). CD14⁺⁺ monocytes, CD14⁺/CD16⁺ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37(3):209-213.
53. Schut, C., (1999). Fighting Infection: The Role of Lipopolysaccharide Binding Proteins CD14 and LBP. *Pathobiology*, 67:227-229.
54. Selvaraj, P., Chandra, G., Jawahar, S., Rani Vidya, M., Nisha Rajeshwari, D., Narayanan, P., (2004). Regulatory Role of Vitamin D Receptor Gene Variants of *Bsm1*, *Apal*, *TaqI*, and *FockI* Polymorphisms on Macrophage Phagocytosis and Lymphoproliferative Response to *Mycobacterium tuberculosis* Antigen in Pulmonary Tuberculosis. *J. Clin. Immunol.*, 24-5:523-531.
55. Shaffer, L., Gerwirth, T., (2004). Structural analysis of RXR-VDR interactions on DR3 DNA. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, 89-90:215-219.
56. Spittler, A., Willheim, M., Leutmezer, F., Öhler, R., Krugluger, W., Reissner, C., Lucas, T., Brodowicz, T., Roth, E., Nitulescu, B., (1996). Effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and cytokines on the expression of MHC antigens, complement receptors and other antigens on human blood monocytes and U-937 cell: role in cell differentiation, activation and phagocytosis. *Blackwell Science Ltd, Immunology*, 90:286-293.
57. Swanson, A., Hoppe, D., (2004). The coordination of signaling during receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.*, 76:1093-1103.
58. Tokuda, N., Levy, RB., (1996). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 84:200-206.
59. Trinchieri, G., Rosen, M., Perussia, B., (1987). Induction of Differentiation of Human Myeloid Cells Lines by Tumor Necrosis Factor in Cooperation with 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Research*, 47:2236-2242.
60. Turpin, A.J., López, G., (1993). Differentiation, maturation and activation of monocytes and macrophages: functional activity controlled by a continuum of maturation. *Mononuclear Phagocytes in Cell Biology* (Ed. CRC Press, Inc.) 71-99.
61. Van Vugt, J., Van de Winkel, J., (2001). Fc receptors. *Encyclopedia of life sciences* 1-8.
62. Vieira, V., Botelho, J., Grinstein, S., (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. S.*, 366:689-704.
63. Viera, V., Botelho, J., Rameh, L., Brachmann, M., Matsuo, T., Davidson, W., Schreiber, A., Backer, M., Cantley, C., Grinstein, S., (2001). Distinct roles of class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.*, 155:19-25.
64. Wrigth, S.D., Silverstein, S.D., (1983). Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J. Exp. Med.*, 158:2016-2023.

65. **Yu, B., Hailman, E., Wright, S. D.**, (1997). Lypopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalize exchange of phospholipids. *J. Clin. Invest.*, 99:315
66. **Zehnder, D., Bland, R., Chana, S., Wheeler, C., Howie, J., Williams, C., Stewart, M., Hewinson, M.**, (2002). Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by Human Endothelial Cells is Regulate by Inflammatory Cytokines: A Novel Autocrine Determinant of Vascular Cell Adhesion. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13:621-629.
67. **Ziegler-Heitbrock, H.W., Ulevitch, R.J.**, (1993). CD14: cell superface receptor and differentiation marker. *Immunol. Today* 10:510-516.

ANEXO I

SOLUCIONES

A) AISLAMIENTO DE MONOCITOS HUMANOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

Solución Stock HEPES-EDTA 100X

100 mM de EDTA.....3.722 g
1 M de HEPES.....23.83 g
Agua destilada.....100 mL
pH 7.4 ajustar con NaOH

Solución HEPES-EDTA-BSA*♣

0.85% (m/v).....0.85 g
Sol. Stock HEPES-EDTA 100X.....1 mL
0.5% BSA0.5 g
Agua mili Q cbp.....100 mL
pH 7.4 ajustar con NaOH
Preparar el día que se utilice.

Solución de Optiprep 1.078**♣

Optiprep™.....2 mL
Solución HEPES-EDTA-BSA.....6 mL
Preparar el día que se utilice.

Solución de Optiprep 1.068**♣

Optiprep™.....4 mL
Solución HEPES-EDTA-BSA.....16 mL
Preparar el día que se utilice.

PBS 20X (solución amortiguadora de fosfatos)

2.6 mM NaH₂PO₄·H₂O.....7.2 g
7.74 mM Na₂HPO₄ anhidro.....22g
0.16 mM NaCl175 g
Agua destilada.....1 L
pH 7.4 ajustar con NaOH (lentejas).

PBS 1X*

PBS 20X25mL
Agua mili Q cbp.....500 mL
pH 7.4 NaOH/HCl

Solución amortiguadora para MACS (MBS)*♣

2mM EDTA.....74.45mg
0.5% S. Aut.....0.5 mL
PBS 1X.....100 mL
pH 7.2 ajustar con NaOH/HCl
Desgasificado.

Solución de lisis**

Se tiene que preparar unos minutos antes de usarla.

Stock I.....5 mL
Stock II.....2 mL

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Stock III.....	1 mL
Agua miliQ*.....	2 mL
Stock I*♣	
Cloruro de amonio	16.58 g
Agua MiliQ	1 L
Stock II*♣	
NaHCO ₃	8.4 g
Agua Mili Q.....	1 L
Stock III*♣	
EDTA.....	0.146 g
Agua MiliQ.....	1 L

B) DIFERENCIACIÓN *in vitro* DE LOS MONOCITOS HUMANOS AISLADOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA (MSP) Y DE LAS CÉLULAS MIELOMONOCÍTICAS U-937.

Medio RPMI 1640*♣	
Medio RPMI deshidratado.....	1 sobre
NaHCO ₃	2.2 g
25mM Hepes.....	5.9575 g
2 Mercaptoetanol (Dil. 1:100 en H ₂ O).....	7.8 µL
Agua MiliQ cbp.....	1 L
pH 7.4-7.6 ajustar con NaOH	
RPMI complementado**♣	
2mM L-Glutamina.....	5 mL (Stock 100X)
1000 U/ml Penicilina G.....	5 mL (Stock 100X)
1mM Piruvato de sodio.....	5 mL (Stock 100X)
0.1 mM aminoácidos no esenciales.....	5 mL (Stock 100X)
10% suero fetal bovino ó	
Suero autólogo.....	50 mL
inactivado (30 min 56°C)	
Medio RPMI*.....	420 mL (El contenido de una botella)
Solución Stock de 1- α ,2-hidroxi vitamina D3 100 µM (1000X)**	
1- α ,2-hidroxivitamina D3, MM: 416.7.....	50 µg
Etanol (p.a.)*.....	1.2 mL
Conservar a -80°C protegido de la luz.	

C) DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE MEMBRANA POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA E INDIRECTA

Solución amortiguadora de lavados♣	
0.1% azida de sodio (NaN ₃).....	0.1 g
5% (v/v) SFB.....	5 mL
PBS 1X cbp.....	100 mL
pH 7.4 ajustar con HCl	

Solución de PFA 1%♣

1% paraformaldehído (PFA)1 g
PBS 1X cbp.....100 mL

pH 7.5 ajustar con HCl

El PFA se disuelve calentando el PBS a 50°C y unas gotas de NaOH. Una vez disuelto, enfriar y ajustar el pH.

D) FAGOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES Fcγ EN CÉLULAS U-937 Y MSP EN SUSPENSIÓN.

Solución de Alsevers*♣

dextrosa.....10.25 g
NaCl.....2.1 g
citrato de sodio.2H₂O.....0.275g
agua miliQ cbp.....500 mL
pH 6.2 ajustar con HCl

DGVB*♣

2.5 mM veronal (barbital).....0.23 g
75 mM NaCl.....2.1 g
2.5% dextrosa12.5 g
0.05% gelatina.....0.25 g
15 mM CaCl₂.....75 µL del Stock 1M
0.5 mM MgCl₂.....250 µL del Stock 1 M
pH 7.5 ajustar HCl
filtrar en caliente, < 45°C.

Stock CaCl₂

1 M CaCl₂.....11.11g
agua miliQ cbp.....100 mL

Stock MgCl₂

1 M MgCl₂.....20.33g
agua miliQ cbp.....100 mL

Solución amortiguadora de boratos*♣

0.2 M Ac. bórico.....12.368 g
0.15M NaCl.....8.755 g
agua destilada cbp1 L
pH 8.5 ajustar con NaOH

Solución de TNBS*♣

ac.2,4,6-tinitrobenzensulfónico (TNBS)12.44 mg
solución amortiguadora de boratos7 mL
preparar unos minutos antes de usarla.

*Las soluciones se deben de filtrar en esterilidad con filtro con tamaño de membrana de 0.22 µm.

**La preparación de estas soluciones debe de realizarse en condiciones de esterilidad.

♣ Conservar a 4°C protegidas de la luz.

ANEXO II

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Para poder realizar las comparaciones con las células que recibieron el tratamiento con VD3 y las que no lo recibieron se tomaron en cuenta sólo los resultados en los que se tenían ambos datos (es decir con y sin tratamiento). Los datos en los que sólo se tienen datos a los diferentes tiempos con VD3 no se consideraron en los cálculos realizados. La prueba aplicada es la prueba t de Student para datos pareados.

A) NIVEL DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR

La media que se muestra corresponde a la diferencia de la media de intensidad de fluorescencia del receptor de las células con y sin VD3 en los experimentos realizados.

CD14

Monocitos				
	tiempo (h)	24	48	72
	\bar{x}	58.20	83.11	241.92
	d.s.	49.74	55.08	236.29
	t_{calc}	4.378	5.226	1.773
	n	13	11	3
$\alpha 0.05$	t_{teo}	1.782	1.812	2.92
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho			si
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi	si	si	

U-937				
	tiempo (h)	24	48	72
	\bar{x}	6.21	17.89	17.13
	d.s.	3.94	11.39	3.67
	t_{calc}	3.519	3.511	6.659
	n	5	5	2
$\alpha 0.05$	t_{teo}	2.132	2.132	6.314
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho			
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi	si	si	si

FcγRI (CD64)

Monocitos				
	tiempo (h)	24	48	72
	\bar{x}	1.46	-0.70	-1.73
	d.s.	10.58	4.79	6.219
	t_{calc}	0.478	-0.463	-0.558
	n	12	10	4
$\alpha 0.05$	t_{teo}	1.796	1.833	2.353
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho	si	si	si
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi			

U-937				
	tiempo (h)	24	48	72
	\bar{x}	-0.37	1.49	2.63
	d.s.	1.758	1.771	1.305
	t_{calc}	-0.465	1.688	2.856
	n	5	4	2
	$\alpha 0.05 t_{teo}$	2.132	2.353	6.314
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho	si	si	si
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi			

FcγRII (CD32)

Monocitos				
	tiempo (h)	24	48	72
	\bar{x}	3.76	3.43	22.14
	d.s.	8.414	8.576	8.72
	t_{calc}	1.672	1.384	4.397
	n	14	12	3
	$\alpha 0.05 t_{teo}$	1.771	1.796	2.92
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho	si	si	
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi			si

U-937				
	tiempo (h)	24	48	72
	\bar{x}	3.989	1.464	5.85
	d.s.	3.4404	2.339	1.216
	t_{calc}	2.5926	1.4	6.802
	n	5	5	2
	$\alpha 0.05 t_{teo}$	2.132	2.132	6.314
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho			
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi	si	si	si

CR3

Monocitos				
	tiempo (h)	24	48	72
	\bar{x}	-78.67	80.55	4.95
	d.s.	87.19	61.16	33.71
	T_{calc}	-1.805	2.281	0.208
	N	4	3	2
	$\alpha 0.05 T_{teo}$	2.353	2.92	6.314
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho	si	si	si
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi			

U-937				
tiempo (h)		24	48	72
\bar{x}		3.76	3.43	22.14
d.s.		8.414	8.576	8.72
T_{calc}		1.672	1.384	4.397
N		14	12	3
$\alpha 0.05$ T_{teo}		1.771	1.796	2.92
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho	si	si	
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi			si

HLA-DR

Monocitos				
tiempo (h)		24	48	72
\bar{x}		-78.67	80.55	4.95
d.s.		87.19	61.16	33.71
T_{calc}		-1.805	2.281	0.208
N		4	3	2
$\alpha 0.05$ T_{teo}		2.353	2.92	6.314
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho	si	si	si
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi			

U-937				
tiempo (h)		24	48	72
\bar{x}			51.48	63.02
d.s.			16.02	17.12
t_{calc}		N.D.	6.426	6.376
n			2	2
$\alpha 0.05$ t_{teo}			6.314	6.314
$t_{calc} \leq t_{teo}$	Ho			
$t_{calc} > t_{teo}$	Hi		si	si

N.D. No determinado

B) FAGOCITOSIS

La media corresponde a la diferencia de los índices fagocíticos de las células con y sin VD3 de los triplicados realizados.

Fagocitosis mediada por IgG1

Exp.	Monocitos								
	1			2			3		
tiempo (h)	24	48	72	24	48	72	24	48	72
\bar{x}	-3	21.66	-13.3	-6	1.67	-1	34.5	45	
d.s.	1.73	4.72	13.5	23.06	19.5	2.64	10.6	9.9	
t_{calc}	-1	2.65	-0.57	-0.15	0.05	-0.22	1.88	2.62	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$\alpha 50.0$ t_{teo}	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92
$t_{calc} \leq t_{teo}$ Ho	si	si	si	si	si	si	si	si	
$t_{calc} > t_{teo}$ Hi									

Exp.	U-937								
	1			2			3		
tiempo (h)	24	48	72	24	48	72	24	48	72
\bar{x}	5	58.66	103.3	7	10.33	66	9	14.66	54
d.s.	6.55	2.87	4.62	11.53	8.73	11.5	4.36	4.04	2.67
t_{calc}	0.44	11.73	12.92	0.35	0.68	3.3	1.19	2.09	11.8
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$\alpha 50.0$ t_{teo}	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92
$t_{calc} \leq t_{teo}$ Ho	si			si	si		si	si	
$t_{calc} > t_{teo}$ Hi		si	si			si			si

Fagocitosis mediada por IgG2b

		Monocitos								
Exp.		1			2			3		
	tiempo (h)	24	48	72	24	48	72	24	48	72
	\bar{x}	-5.66	0	4	-14	9	18.3	13.33	22.67	26.7
	d.s.	2.64	4.16	11.54	18.52	21.22	2.64	37.5	3.51	56
	t_{calc}	-1.23	0	0.2	-0.43	0.24	4	0.21	3.73	0.27
	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$\alpha 50.0$	t_{leo}	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92
$t_{calc} \square t_{leo}$	Ho	si	si	si	si	si	si	si		si
$t_{calc} \square t_{leo}$	Hi								si	

		U-937								
Exp.		1			2			3		
	tiempo (h)	24	48	72	24	48	72	24	48	72
	\bar{x}	4	14.67	45.33	0	28.33	66.3	7.67	23.67	59.3
	d.s.	4.93	4.04	2	10.26	5	8.54	3.61	2.31	3
	t_{calc}	0.47	2.09	13.09	0	3.27	4.48	1.23	5.91	11.4
	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3
$\alpha 50.0$	t_{leo}	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92	2.92
$t_{calc} \square t_{leo}$	Ho	si	si		si			si		
$t_{calc} \square t_{leo}$	Hi			si		si	si		si	si