



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"**

**INDUCCIÓN A LA DIFERENCIACIÓN CON INTERFERON  $\gamma$ , ÁCIDO  
RETINOICO Y VITAMINA D3 DE CELULAS DE LA LÍNEA CELULAR  
MIELOIDE THP-1**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

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

**EDUARDO MORALES RAMIREZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. ISABEL SOTO CRUZ**

**ASESOR: DRA. MARÍA TERESA CORONA ORTEGA**



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE ONCOLOGÍA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DE DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ISABEL SOTO CRUZ Y LA ASESORIA DE LA DRA. TERESA CORONA ORTEGA.

EL PROYECTO RECIBIÓ APOYO DE LA DGAPA (PAPIIT IN213701 Y PAPIIT IN202304).

## *Agradecimientos.*

**A ESA PAREJA DE ESPOSOS QUE BRINDARON LAS BASES PARA CREAR A UN SER HUMANO CON VALORES MORALES JUSTOS, ADEMAS DE SUMINISTRAR CARIÑO Y APOYO EN TODO MOMENTO DE MI VIDA A ESA PAREJA, QUE SON MIS PADRES ES ESTE TRABAJO PARTE DE SU FRUTO.**

**POR SENTIR UN APOYO INCONDICIONAL Y POR DARME ANIMOS EN ESOS MOMENTOS DIFICILES EN MI VIDA, POR SER UNA GRAN AMIGA Y SER MI HERMANA NAGHELI. MUCHAS GRACIAS A TI Y A TU ESPOSO.**

**POR SER PARTE DE MI NIÑEZ Y SER PARTE DE MI CRECIMIENTO GRACIAS HERMANA ELENA.**

**DURANTE MUCHO TIEMPO TRABAJE EN ESTA TESIS Y EN ESTE MOMENTO DE MI VIDA HE VUELTO A ENCONTRAR EL AMOR QUE ME HA PROPORCIONADO MAS AYUDA Y APOYO DE LA QUE PUDE ESPERAR, SU FRANQUEZA, PACIENCIA Y EXTREMADA INTELIGENCIA ME HA HECHO LOGRAR ESTE OBJETIVO. GRACIAS DORA AMOR.**

**A TODO EL EQUIPO DE DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER DE LA FES ZARAGOZA POR DARME LA OPORTUNIDAD DE CONOCER UNA RAMA DISTINTA A LA QUE CONOZCO A ARTURO, TOÑO Y ALEJANDRO POR SER PARTE DE ESTO Y EN ESPECIAL A LA DOCTORA ISABEL Y LA DOCTORA TERESA CORONA POR SU CALIDAD HUMANA, SU PROFESIONALIDAD Y PACIENCIA GRACIAS.**

**A ESA PERSONA PERFECCIONISTA QUE HA DEJADO ESA HUELLA EN MI PERSONA Y POR TENERME PACIENCIA GRACIAS ALEJANDRA M SALAZAR.**

**POR SU CHISPA DE INVESTIGADOR, SU ENTUSIASMO, QUE NO ES FACIL ENCONTRAR A NADIE COMO EL QUIMICO FERNANDO JAUREGUI. GRACIAS POR PODER FORMAR PARTE DE SU EQUIPO DE TRABAJO.**

**A CONNY Y EVA NOEMI USTEDES SABEN TODO LO QUE HAN CONTRIBUIDO PARA AYUDARME DESDE EL PRINCIPIO DE MI VIDA LABORAL. MUCHAS GRACIAS.**

**TAMBIEN ESTOY EN DEUDA CON ILIANA POR DEJARME BENEFICIARME DE SU CONOCIMIENTO Y BRINDARME SU AMISTAD GRACIAS A TI Y A MIGUEL.**

**TENGO UNA INMENSA DEUDA CON JESUS SOTO POR SUS PALABRAS Y CONOCIMIENTO GRACIAS INGENIERO.**

**Y EN ESPECIAL A DIOS POR HACER QUE EL UNIVERSO CONJUNTARA LOS HILOS DE NUESTROS DESTINOS PARA LOGRAR ESTO.**

## INDICE.

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
Respuesta inmunológica.	5
Citocinas que estimulan la atracción de leucocitos.	12
INTERFERÓN GAMMA (INFg)	13
ÁCIDO RETINOICO	14
VITAMINA D3	15
RECEPTORES Fc	17
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
HIPÓTESIS	23
MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.	24
METODOLOGÍA.	26
DIAGRAMA DE FLUJO	26
CULTIVO CELULAR	27
CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS	27
INDUCCIÓN A LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.	28
ENSAYO DE GLUCORONIDASA	30
ENSAYO ENZIMÁTICO b-GLUCORONIDASA.	30
ENSAYO DE FOSFASA ÁCIDA Y ALCALINA.	31
ENSAYO ENZIMÁTICO FOSFATASA ÁCIDA Y ALCALINA.	31
FAGOCITOSIS.	32
RESULTADOS.	33
Efecto de los agentes diferenciadores sobre la actividad enzimática.	39
EFFECTO DE LA VD3 SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	41
EFFECTO DE AGENTES DIFERENCIADORES SOBRE LA FAGOCITOSIS	46
Figura 10b	47
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	47
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS.	56
BIBLIOGRAFIA	57



## RESUMEN

Durante el proceso de diferenciación celular, las células hematopoyéticas sufren una serie de cambios moleculares, bioquímicos y morfológicos que les permiten realizar una serie de funciones específicas. En particular, los macrófagos son células altamente especializadas y entre sus funciones más importantes destacan la defensa del organismo contra cuerpos extraños y la secreción de factores que regulan diversas funciones fisiológicas.

Para analizar el efecto de agentes diferenciadores tal como el Interferón gamma (INF- $\gamma$ ), ácido retinoico (AR) y la vitamina D3(VD3), en el proceso de diferenciación de monocito a macrófago, se cultivó la línea monocítica THP-1 en presencia tanto de INF- $\gamma$ , AR y VD3 por separado, así como combinaciones. Se observaron cambios morfológicos y funcionales evidentes utilizando los dos factores juntos. El INF- $\gamma$  y AR inducen a un aumento en la actividad enzimática lisosomal, siendo más evidente en presencia de AR, se observa un efecto sinérgico en estos factores, siendo mucho más evidente el aumento en la actividad de la fosfatasa ácida,  $\beta$ -glucuronidasa y recuentos celulares. Aunque son más evidentes los cambios morfológicos y funcionales solo con la VD3 induciendo un aumento marcado en la actividad enzimática lisosomal. Es importante evaluar el efecto de estos agentes diferenciadores para determinar su participación en los procesos de diferenciación celular y poder establecer un modelo *in vitro* para analizar la función de diversas moléculas de superficie celular, tal como receptores para inmunoglobulinas, en células diferenciadas y no diferenciadas.



## INTRODUCCIÓN

El desarrollo en las reacciones que suceden en los seres vivos, sus ciclos celulares así como sus reacciones intracelulares, paralelamente con los avances obtenidos en la física en el último siglo y las ventajas de desenmarañar los misterios del átomo, han llevado a un desarrollo en el descubrimiento de moléculas y estructuras biológicas las cuales conllevan al rápido desciframiento de los genes tanto en células procariontas como eucariontas aunado a la identificación del genoma humano, son hechos que han revolucionado la medicina.

Aunque con menor auge, en la última década se han dilucidado mecanismos importantes como el control del crecimiento celular, la regulación de la división celular, la regulación y desarrollo embriológico y por tanto las posibles causas de diferentes enfermedades. Estos descubrimientos en conjunto con los desarrollos tecnológicos han dado paso a diagnósticos genéticos así como a una amplia gama de tratamientos no sólo por la parte genética sino también por el descubrimiento y desarrollo de drogas que en algunos casos pueden cambiar la práctica de la medicina.

Llamamos diferenciación al proceso por el cual las células de un metazoario, de un organismo superior, a pesar de que poseen todas un idéntico genoma, fabrican ciertas moléculas y no otras de las que especifican sus genes, hasta hacer que su estructura y función difieran notablemente de las células originales, convirtiéndose en células maduras (eritrocitos, macrófagos, osteocitos, neuronas, adipocitos, etcétera) que componen nuestro cuerpo.

Las células de todo nuestro organismo presentan a diario procesos de diferenciación, desde que nacemos hasta nuestra muerte se llevan a cabo procesos de diferenciación celular; en el caso de la línea celular THP-1 la diferenciación no se ha llevado a cabo, esta es un tipo de leucemia infantil en la cual, el monocito no se ha podido diferenciar a macrófago.

Así pues, el problema de estudio descrito en el párrafo anterior, es consecuencia de una serie de investigaciones que lo anteceden como estudios realizados en Japón al probar INF- alfa en células U-937, otra línea celular de características muy semejantes a las que presenta este estudio, las THP-1 para diferenciar estas células, además de la utilización de liposomas los cuales son una forma de encapsular los fármacos y que han sido utilizados desde 1970 y encontrando que este tipo de forma farmacéutica incrementa la potencia de algunos fármacos.

Por lo anterior y por el impacto que en estos momentos está teniendo la biología en todos sus ámbitos, es importante fortalecer la formación del Q.F.B, el cual ha tenido orientación en farmacia y el contacto con estas ramas es muy poca.

## MARCO TEÓRICO

### Respuesta inmunológica.

En el desarrollo de las células hematopoyéticas, se producen varias líneas que generan finalmente a todas las células sanguíneas, entre las cuales se encuentran los neutrofilos, eosinófilos, eritrocitos, linfocitos y las células del linaje monocito-macrófago entre otras, generándose a partir de una célula madre pluripotencial.<sup>3</sup>

La respuesta inmune mediada por células implica la formación de células especializadas que reaccionan principalmente con los antígenos extraños situados sobre la superficie de las células huésped, ya sea matando la célula hospedera si el antígeno es un virus infectivo o induciendo a otras células del huésped, como por ejemplo activando a los macrófagos para destruir el antígeno.<sup>1</sup>

Durante el proceso de diferenciación celular, las células hematopoyéticas sufren una serie de cambios moleculares, bioquímicos y morfológicos que les permiten realizar una serie de funciones específicas. Las células en proceso de diferenciación también pierden su habilidad de proliferación en comparación con las células parentales.

Para el desarrollo de la línea monocito – macrófago, se forman primero los monoblastos, que tienen un tamaño de 15 a 25 micras aproximadamente, teniendo un núcleo grande y redondo, así como cromatina laxa con 5 núcleos visibles, citoplasma abundante y basofilia intensa, el monoblasto es la célula precursora menos diferenciada, lo que se refleja por su ultraestructura. Es positivo para lisozima y esterasa no específica en pequeñas cantidades. Todos los monoblastos tienen receptores en sus superficies llamados FcR y son capaces de fagocitar eritrocitos recubiertos con inmunoglobulina G (IgG).<sup>2</sup> La división de este tipo celular da lugar al promonocito, el cual tiene un tamaño celular de 15-20 micras y su núcleo presenta contornos irregulares con pliegues, cromatina poco condensada, sus núcleos visibles pueden ser de 0-1, su citoplasma es abundante, basófilo y fina granulación azurófila. La división de este tipo celular da

lugar al promonocito, que es el precursor directo de los monocitos. Estas células contienen lisozimas las cuales tienen la función de catalizar la hidrólisis de ciertos enlaces glucosídicos de los polisacáridos complejos presentes en las paredes celulares de algunas bacterias, también contienen esterasas al igual que las lisozimas, pero estas rompen enlaces en forma éster. Estas dos enzimas son no específicas, además de gránulos positivos para peroxidasa, presentan receptores para IgG, receptores para C3b e ingieren eritrocitos recubiertos por IgG y bacterias opsonizadas, pero la fagocitosis de eritrocitos opsonizados con C3b es relativamente pobre.<sup>2</sup>

Los monocitos permanecen en la médula ósea por 24 horas al menos, antes de entrar al torrente sanguíneo y distribuirse entre reservas marginales y circulantes.<sup>7</sup>

Los monocitos son células pequeñas de 12-15 $\mu$ m de diámetro, con un núcleo que ocupa el 50% del área de la célula reniforme, con un patrón irregular de cromatina cuyo citoplasma contiene gránulos azurofilos<sup>2</sup>. En humanos adultos normales, los monocitos de sangre periférica representan entre el 1 y el 6% del total de células blancas y raramente exceden el 10%.<sup>7</sup>

La migración de los monocitos de sangre periférica a los tejidos extravasculares involucra la adherencia al endotelio, la migración entre las células endoteliales y la subsecuente migración entre las estructuras subendoteliales.

Citocinas como la interleucina 1 (IL-1) y el interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) incrementan la expresión de moléculas de adhesión, como ICAM-1 en la superficie de células endoteliales y por tanto pueden facilitar la migración de los monocitos y su migración a los sitios de inflamación<sup>4</sup>. Al arribar al órgano blanco, los monocitos se diferencian a macrófagos y permanecen en los tejidos por varios meses<sup>9</sup>.

## CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS:

### FAGOCÍTICAS:

- Monocitos.
- Macrófagos.
- Células dendríticas

### NO FAGOCÍTICAS:

- Linfocitos B

Los monocitos-macrófagos son conjuntamente con las células dendríticas y los linfocitos B, las únicas células que expresan en su superficie los antígenos de histocompatibilidad y por tanto, las únicas células capaces de poder presentar antígenos a los linfocitos cooperadores CD4+. Este grupo celular, se conoce como: Células Presentadoras de Antígenos (CPAg) o (APC) de sus siglas en ingles "Antigen Presenting Cells".

Los macrófagos son células grandes, de 25-50 $\mu$ m de diámetro, por lo general presentan un núcleo excéntrico, redondo o en forma de riñón, con uno o dos nucleólos prominentes y cromatina nuclear dispersa. También se observa un complejo de Golgi yuxtannuclear en un citoplasma abundante, con gran cantidad de gránulos azurófilicos y vacuolas cerca de la periferia. En el macrófago se encuentran varias enzimas hidrolíticas, como fosfatasa ácida,  $\beta$ -glucoronidasa, N-acetilglucosaminidasa, lisozima,  $\alpha$ -naftilbutirato esterasa y peroxidasa.<sup>2</sup>

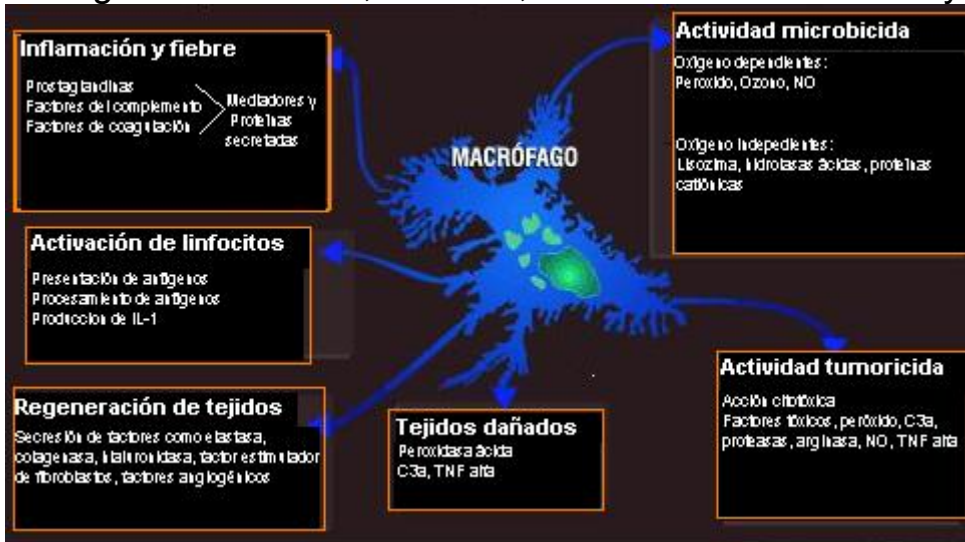


FIGURA 1.

Papel central de los Macrófagos en la inflamación e inmunidad.

Internet página [www.canovadobrasil.com.br/imagens/macrofago](http://www.canovadobrasil.com.br/imagens/macrofago)

Al responder a estímulos propios y no propios, los macrófagos desempeñan distintas funciones, como la fagocitosis y destrucción de microorganismos, el procesamiento y presentación de antígeno, secreción de mediadores inflamatorios y citocinas, además del control de células tumorales como se observa en la fig. 1<sup>7</sup>. Los macrófagos expresan una amplia gama de receptores de membrana, que les permiten responder a distintas hormonas, proteínas endógenas y exógenas, así como a polisacáridos y lípidos.

Como células presentadoras, participan en la inducción de la inmunidad adquirida capturando y procesando los antígenos para, presentarlos al linfocito T (CD 4). Por último, los macrófagos sintetizan un gran número de linfocinas: Interleucinas: 1, 2, 6, 12, interferón alfa y beta, factor alfa de necrosis celular (TNF-alfa). Así como, los componentes del complemento: C2, C3, C4 y C5 y varias enzimas.

Las células dendríticas son también células presentadoras de antígenos (CPAg) y por tanto disponen de capacidad para la captación de antígenos de forma natural. Las células dendríticas, al igual que los monocitos-macrófago, se localizan en los tejidos de captación (piel y mucosas) y en los de presentación (ganglios y bazo). En una zona donde presentan especial actividad es en la piel, donde su misión es capturar los antígenos que entran por esa vía y llevarlos al ganglio más cercano para su presentación a los linfocitos T CD4+.

El metabolismo basal de los macrófagos aumenta por la interacción receptor-ligando, lo que resulta en el estallido respiratorio que origina la reducción de oxígeno molecular a superóxido que es convertido rápidamente en peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo que proveen gran parte de la actividad microbicida tanto dentro del fagosoma como en el espacio extracelular<sup>1</sup>.

En la regulación del crecimiento y diferenciación del tipo celular que da origen a los macrófagos, intervienen citocinas como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófago-granulocito (GM-CSF), los cuales estimulan la producción y función de fagocitos mononucleares<sup>2</sup>. La producción

de estos factores de crecimiento es estimulada por la exposición a estímulos externos como endotoxinas o partículas fagocitables<sup>2</sup>.

Los macrófagos juegan un papel muy importante en la defensa contra una gran variedad de agentes infecciosos, que incluyen bacterias, virus, protozoarios y hongos. Durante la infección, las células son atraídas al foco de infección por componentes bacterianos, endotoxinas, componentes del complemento, complejos inmunes y fragmentos de colágeno<sup>2</sup>.

En el proceso de la fagocitosis se pueden diferenciar cuatro etapas distintas, si bien es un proceso continuo. Estas etapas son:

- **Quimiotaxis o atracción.**
- **Adherencia y opsonización.**
- **Ingestión y vacuolización.**
- **Digestión o destrucción.**

Otra de las características de los macrófagos es su movimiento ameboide, el cual propicia que recorra las superficies del cuerpo logrando con ello encontrarse con agentes extraños, iniciando el ataque fagocitando y destruyéndolos o destruyéndolos parcialmente para después presentarlos con las células linfocíticas T y B.<sup>9</sup>

Los macrófagos juegan un papel importante al encontrarse en todos los órganos y tejidos conectivos, en numerosos procesos biológicos de defensa del cuerpo.

En las primeras etapas de diferenciación en la medula ósea se encuentran los monocitos, que de manera natural se diferencian a macrófagos, en el caso de infantes con leucemia monolítica aguda no se logra esta diferenciación, lo cual resulta en la presencia de células THP-1 en sangre periférica las cuales son monocitos no diferenciados incapaces de realizar las funciones de un macrófago.

## CARACTERISTICAS DE LA LÍNEA CELULAR THP-1.

THP-1	Humana
Producen	lisozimas
Receptores	Complemento C3 y expresan receptores Fc.
Morfología	Células redondas, algunas simples en suspensión y otras asociadas en grupos.
Contaminaciones probables	Micoplasma puede ser eliminado con ciprofloxacina
Medio de propagación	RPMI1640
Condiciones de cultivo	37 °C, 95% de aire y 5% CO <sub>2</sub>
Tiempo de duplicación	26 hrs
Proteínas de superficie	CD3,CD4,CD13,CD14,CD15,CD19,CD33,CD34 CD68

### **Cuadro 1**

© by DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



## Citocinas que estimulan la hematopoyesis.

Los efectos que presentan los macrófagos son mediados por citocinas, que son péptidos o glucoproteínas de peso molecular de 600 a 60000 Daltones. Estas citocinas son secretadas por distintas células específicas (efectoras) del cuerpo. <sup>1</sup>

Es importante mencionar que las citocinas administradas en altas concentraciones pueden ser extremadamente tóxicas, un ejemplo son las citocinas de fase aguda.

El otro grupo funcional en el que se agrupan las citocinas, es el conocido como estimuladoras de la hematopoyesis. Debido al enorme esfuerzo celular que lleva consigo la respuesta inmune, se requiere de un sistema que le permita reponer rápidamente el número de células para poder afrontar nuevas infecciones. Las citocinas encargadas de este trabajo actúan fundamentalmente sobre células inmaduras potenciando su maduración y proliferación. Muchas citocinas pueden realizar esta importante función aunque las más importantes son:

- Factor estimulador de colonias granulocito macrófago (GM-CSF)
- Factor estimulador de células precursoras IL-3
- Factor estimulador de macrófagos (M-CSF), IL-7, Eritropoyetina (Epo).

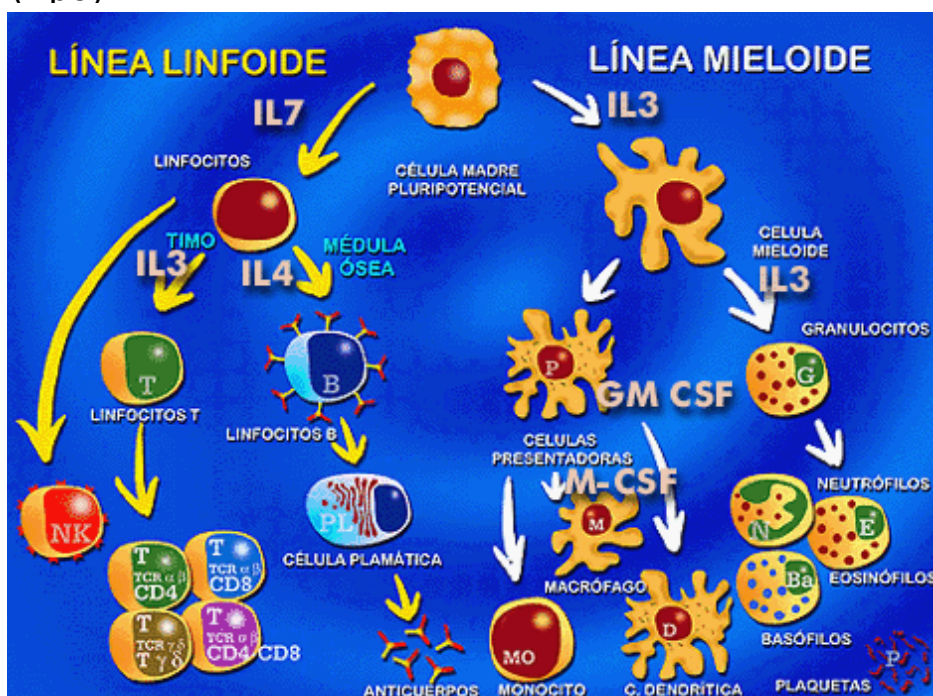


Figura 2.  
Principales citocinas que estimulan la hematopoyesis

Casi todas presentan una estructura en forma de monómeros de entre 19 a 26 kD, con excepción del M-CSF que es un dímero de 40 kD. La mayoría son producidas por los macrófagos y por las células endoteliales. Su función principal está relacionada con la proliferación y diferenciación celular, favoreciendo la madurez celular.

### **Citocinas que estimulan la atracción de leucocitos.**

Se denomina quimiocinas al conjunto de citocinas, más de 15 proteínas pequeñas (7 a 15 kD), producidas por diferentes células inmunes (monocito-macrófago, linfocitos T) y no inmunes (fibroblastos y células endoteliales) que tienen una fuerte capacidad quimiotáctica. Su estructura es un monómero o dímero de entre 7 a 15 kD con unos receptores de membrana caracterizados por poseer siete dominios transmembranales.

## **INTERFERÓN GAMMA (INF $\gamma$ )**

Las citocinas ejercen muchos de sus efectos por interacción con los receptores Fc de la superficie celular. Esta modalidad de la actividad biológica es muy semejante al de las hormonas aunque éstas son más estables frente a la acción proteolítica. Los efectos de éstas son mediados principalmente a nivel local y se asocian con infiltrados hísticos, que suelen iniciarse por los antígenos. Los factores que liberan estas células atraen a otras, estimulan su división y su diferenciación.<sup>7</sup>

Los interferones aumentan la secreción de anticuerpos y la maduración de células plasmáticas.<sup>7</sup>

Este tipo de proteínas o glucoproteínas se producen en células humanas como una respuesta a diferentes estímulos, incluyendo la exposición viral, también puede producirse a través de la tecnología de DNA-recombinante. Existen tres tipos de interferones: interferón alfa, interferón beta e interferón gamma que es el que se utilizará en este trabajo.<sup>8</sup>

El interferón gamma (INF- $\gamma$ ) es una glucoproteína homodimérica pequeña, con un peso molecular de 20-24 kDa, tiene alrededor de 143 aminoácidos, es secretada por las células T activadas y es en general muy activa biológicamente; tiene sólo un gen conocido.<sup>1</sup>

Es interesante mencionar algunos de los efectos que puede tener si se maneja de forma no adecuada, algunas de las reacciones que se han reportado en estudios clínicos con estas citocinas son síntomas de cansancio, fatiga, fiebre, dolores musculares, escalofríos, dolores en las articulaciones como los síntomas del virus de la influenza, puede haber náuseas, diarrea, dolor abdominal en personas que llegan a administrarse por accidente 250,000 U.I.<sup>8</sup>

El INF- $\gamma$  tiene una actividad antitumoral, antiproliferativa y antiviral, es un agente antiparasitario, activa células endoteliales por extravasación, y promueve las reacciones de inflamación en el

organismo. Además el interferón alfa está indicado en el tratamiento de hepatitis crónica de tipo B de origen viral y para enfermedades como el sarcoma de Kaposi.<sup>1</sup>

El INF- $\gamma$  tiene una aplicación eficiente en el tratamiento de cáncer y específicamente de neoplasias sólidas.<sup>1</sup>

También se ha aplicado en algunos casos de leucemias, que es una alteración en el proceso de maduración o diferenciación de las células hematopoyéticas.<sup>2</sup>

## **ÁCIDO RETINOICO**

Por otro lado, agentes como el ácido retinoico el cual es precursor de la vitamina A, que es llamado retinol, siendo éste el aldehído del ácido retinoico, está siendo utilizado por la industria farmacéutica para el tratamiento de leucemias.

El ácido retinoico (AR) cuya fórmula condensada es  $C_{20}H_{28}O_2$  con un peso molecular de 300.44 g/mol es fácilmente oxidable por lo cual se recomienda tenerlo en temperaturas inferiores a 0°C en disolución, es un polvo amarillo cristalino.<sup>10</sup>

En estudios recientes realizados en México se ha encontrado que el ácido retinoico es inductor de muerte celular en el paladar y las extremidades en embriones de seres humanos.<sup>16</sup>

Las células como las U-937 son células mielo-monocíticas al igual que las células THP-1, y Mono Mac6 siendo todas ellas un tipo de leucemia mieloide con falta de maduración. Estudios recientes en líneas celulares, como la U-937 se aplica una cantidad de agente diferenciador y se realizan pruebas como: proliferación, evaluación de fagocitosis de esferas de látex, identificación del receptor (el cual es denominado receptor x retinoic ) que en esta línea celular U-937 existe un sinergismo al aplicar dos diferentes agentes diferenciadores, uno de ellos el ácido retinoico.<sup>13</sup>

Así mismo, en estudios realizados en la línea celular THP-1 para inducir diferenciación a macrófagos en respuesta al forbol 12- miristato

13 -acetato (PMA) se ha encontrado que el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) se produce con el PMA por la diferenciación y que no sucede así para el ácido retinoico. Aunque combinando los agentes químicos se estimula sinérgicamente la interacción entre PMA y ácido retinoico la producción de la interleucina  $-1\beta$  está es inhibida por la actividad en un 80 % de G-CSF producido. Previamente se ha reportado que la interleucina 1 induce en células de la línea THP-1 tratadas con ácido retinoico para estimular la producción de G-CSF cuando son pretratadas con PMA. Usando ligandos sintéticos de ácido retinoico se han analizado receptores de retinoides X (RXR) y receptores de ácido retinoico (RAR), teniendo enlaces selectivos RAR -RXR y RXR-RXR. Con esto se demostró que el ácido retinoico puede también aumentar los niveles de IL-1 e inducir la producción de G-CSF en monocitos primarios en sangre periférica de humano.

### **VITAMINA D3**

Otro de los agentes de diferenciación es la vitamina D3; esta vitamina de fórmula condensada  $C_{27}H_{44}O$  de peso molecular de 384.7g/mol, con características de ser polvo color blanco liposoluble y como cualquier vitamina de ser fácilmente oxidable a la intemperie, tiene atributos ya caracterizados por ejemplo, cuando hay una demanda de calcio en el organismo durante embarazos, menopausia, lactancia, osteoporosis, fracturas, raquitismo etc.

La 1,25-dihidroxitamina D3(VD3), metabolito y forma activa de la vitamina D3, es el ligando para el receptor de vitamina D, que es un miembro de la familia de receptores nucleares. Después de que la 1,25 VD3 se une al receptor, estos forman homodímeros o heterodímeros con los subtipos del receptor X de retinoides, los cuales regulan la expresión de los genes al unirse a los elementos de respuesta en las regiones promotoras de los genes blanco.

La vitamina D3 se deposita en las células del epitelio y estimula la síntesis de RNA, fosfatasa alcalina y una proteína ligadora de calcio.<sup>8</sup>

Además de todos los atributos anteriores la vitamina D3 (VD3) es un potente inductor de la diferenciación monocítica de células

normales y leucémicas, estos efectos son mediados por el receptor nuclear (VDR).<sup>15</sup>

En el presente estudio utilizaremos como sistema a las células THP-1, que se obtuvieron a partir de una leucemia humana y que tienen la característica importante de ser células monocíticas que pueden diferenciarse a macrófago *in-vitro*.

Las líneas celulares mieloides son inmaduras y se obtienen del líquido pleural de los pacientes con esta afección en quienes su sistema inmune es muy vulnerable, pues no están maduras las células que se requieren para fagocitar y mantener una respuesta inmune adecuada.<sup>1</sup>

En otros artículos se informa de resultados en líneas celulares THP-1 en la que se utilizaron agentes como el forbol miristato y VD3 para inducir la diferenciación en esta línea celular con la evaluación de: adherencia, proliferación, fagocitosis, así como la expresión de CD11 y CD14 y la activación por agentes de la diferenciación de PKC (proteína cinasa) observándose cambios en todas las pruebas anteriores, disminución de la proliferación, aumento en la adherencia, aumento en la fagocitosis etc.<sup>12</sup>

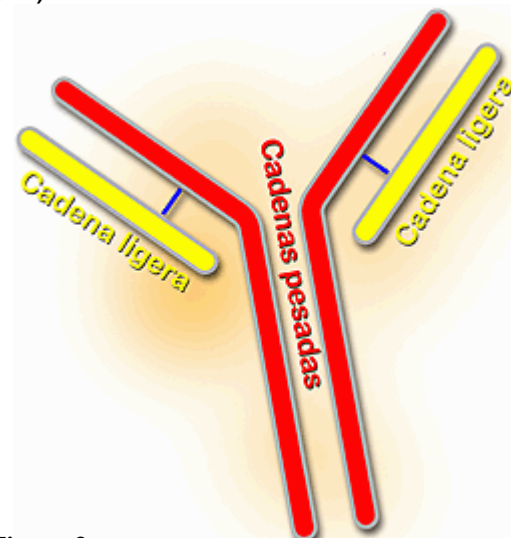
Otro grupo de investigadores realizó estudios del efecto de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 y citocinas en la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) ya que aparte de jugar un papel muy importante en la compatibilidad de órganos, es esencial en el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T (TH humorales así como citotóxicos Tc). Los fenómenos de autoinmunidad dependen parcialmente de esa dotación concreta ya que se han determinado tres tipos de estos complejos: el 1 determina glucoproteínas de membrana que aparecen casi en todas las células nucleadas que sirven para presentar antígenos peptídicos de células propias alternadas a los linfocitos citotóxicos; el 2 determina glucoproteínas de membrana presentadoras de antígeno (Macrófagos Células dendríticas, Linfocitos B ) que sirven para presentar antígenos peptídicos a linfocitos T; el 3 sería el factor de necrosis tumoral (TNF).

## RECEPTORES Fc

Si pretendemos hablar de receptores Fc nuestro primer paso es hablar de las inmunoglobulinas. La estructura básica de una inmunoglobulina (Ig) consta de 4 cadenas polipeptídicas. Existen dos cadenas pesadas (H=heavy) y dos cadenas ligeras (L=light). El peso molecular de las cadenas H oscila entre 55 – 77 Kd y el PM de las cadenas L es de 25 Kd.

Las Igs son glicoproteínas. Las distintas cadenas se estabilizan con puentes disulfuro tanto entre dos cadenas pesadas como entre cada cadena pesada y otra ligera pero nunca entre dos cadenas ligeras.

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras presentan una unidad estructural básica de 110 / 120 cada una. Es el llamado dominio inmunoglobulina, que se repite 4-5 veces en las pesadas y 2 veces en las ligeras. Este dominio está constituido por dos láminas beta, cada una integrada por 3 –4 hélices antiparalelas, estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y un puente disulfuro intracatenario entre dos cisteínas, cada una perteneciente a una de las hélices de cada lámina. Todas las proteínas que presentan este motivo en su estructura pertenecen a la denominada superfamilia de las inmunoglobulinas (fig.3).



**Figura 3.**  
**Inmunoglobulina.**  
Tomado de  
[www.analesdemedicina.com](http://www.analesdemedicina.com)

Las inmunoglobulinas al hacerles reaccionar con proteasas como son la papaína y la pepsina se parten dos fragmentos uno llamado FAB (del inglés “Antigen Binding Fragment” que serían los fragmentos que se enlazan con el antígeno) y una parte Fc (“Crystalizable Fragment” o fragmento cristalizante) que es la parte que se une a los receptores celulares.

Una de las funciones que desempeñan estos anticuerpos son la aglutinación y neutralización del antígeno, al ser los anticuerpos bivalentes es decir, que tienen dos sitios para el reconocimiento del antígeno pueden producir aglutinación del mismo, para su mejor eliminación. Además, cuando se recubre toda la superficie del patógeno con moléculas de anticuerpo, estamos hablando de la neutralización del mismo. Entre otras de sus funciones la opsonización y fagocitosis, al tener ya recubierto el antígeno, puede tener consecuencias posteriores. Los macrófagos tienen receptores para la porción cristalizante, que son llamados FcR, y por tanto pueden engullir los patógenos.

Este tipo de receptores FcR se detectó a principios de los años 60 en células macrofágicas, también este tipo de receptores se encuentra en más alta densidad en otros tipos celulares que participan en la respuesta inmune como son neutrofilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y células asesinas

Como mencionamos anteriormente, que muchas de las funciones efectoras de las inmunoglobulinas están mediadas por su porción constante (fragmento cristalizante =Fc). Para que esto sea así, el sistema inmune ha desarrollado una serie de receptores capaces de reconocer la porción Fc de los diferentes isotipos de Inmunoglobulinas, que se llaman de modo genérico receptores para Fc (FcR). Estos receptores se encuentran ampliamente expresados en diferentes células del sistema inmune (leucocitos y plaquetas). Su nomenclatura va en función del isotipo de inmunoglobulina que reconocen. Así, el receptor para Fc de la IgG se denomina Fc $\gamma$ R, y el de la IgE, Fc $\epsilon$ R. Posteriormente, según se fueron descubriendo diferentes tipos de receptor se les fue poniendo un número romano (I, II, III). Una característica importante de estos receptores es que sólo se unen a la



inmunoglobulina cuando ésta, a su vez, se ha unido al antígeno. Sólo en estas circunstancias la porción constante de la Ig ha sufrido un cambio conformacional que le permite ser reconocida por el Receptor. Una excepción a esta regla, la constituyen algunos receptores para IgE, en particular FcεRI, que se expresa fundamentalmente en mastocitos. Es tan elevada la afinidad de estos receptores por la IgE, que es habitual que las células cebadas se encuentren “cargados” de IgE en su superficie, de modo que si esa IgE encuentra su antígeno específico, las consecuencias del reconocimiento son inmediatas.

Todos los receptores FcR (exceptuando el FcεRII) tienen dominios tipo inmunoglobulina en su estructura, y pertenecen por lo tanto a la superfamilia de las Igs. Los receptores para las Igs poseen colas citoplasmáticas implicadas en la transducción a través de motivos ITAM (Inmunoreceptor Tirosina based Activation Motif), o bien se asocian a otras proteínas especializadas en esta función. La naturaleza de la respuesta iniciada por la unión de la molécula de anticuerpo depende del isotipo de inmunoglobulina reconocido y del tipo de célula que expresa el receptor. En cualquier caso, es necesario el entrecruzamiento de receptores para que se inicien los procesos de señalización. Las respuestas inducidas por los receptores para Igs son variadas: endocitosis (fagocitosis de los patógenos para su destrucción o para la presentación de antígeno), exocitosis (secreción de sustancias líticas para destruir las células infectadas, o secreción de sustancias inflamatorias o de citocinas)

En la diferenciación de linaje mieloide hay una característica llamativa: todas las células precursoras expresan HLA-DR, pero al final de la diferenciación sólo las células presentadoras de antígenos mantienen dicha expresión (esto es la estirpe monocito-macrófago). La molécula CD34 con funciones de adhesión celular, resulta ser el marcador más primitivo en la diferenciación, de hecho se utiliza en la práctica clínica para seleccionar células primordiales pluripotentes (o células stem), y no expresa en ninguno de los tipos celulares finales. CD16 (receptor para Fc de Igs) aparece en todas las células, pero se expresa más en granulocitos que en monocitos. El mejor marcador para la estirpe monocito-macrófago parece ser CD14 (receptor para lipo-polisacáridos bacterianos), prácticamente ausente en los granulocitos. Por el contrario, CD17 (implicado en transducción de

señales) es mejor marcador de granulocitos, aunque también se ha encontrado expresado en plaquetas. Todas las células del linaje mieloide expresan diferentes isoformas de CD45 (que es el mejor marcador pan-leucocitario) así como distintas integrinas: siendo CD18 común (expresado algunas veces junto con CD11b y otras junto a CD11c)

## JUSTIFICACIÓN

Las células del sistema fagocítico mononuclear juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmunológica, así mismo, desempeñan una gran variedad de funciones efectoras que forman parte de los mecanismos de defensa del organismo.

La capacidad de estas células para llevar a cabo la gran diversidad de funciones depende de el estado de diferenciación-activación que posee la célula al momento del estímulo. Dicho estado está gobernado por la influencia o acción de diversos factores inductores de diferenciación que se localizan en el microambiente celular.

Para estudiar los efectos de un agente determinado, debemos contar con poblaciones celulares homogéneas. Esto es posible usando modelos celulares de diferenciación *in vitro* que partan de una sola línea celular. Como un paso inicial para el estudio de la cascada de eventos moleculares responsables de los cambios producidos por agentes inductores de diferenciación en las células del sistema fagocítico mononuclear, es necesario caracterizar *in vitro*, bajo las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio, los efectos de éstos sobre algunas propiedades de las líneas celulares promonocíticas U-937 y THP-1, que son inducibles a diferenciarse. Esto nos permitirá correlacionar las modificaciones en la expresión de ciertos genes, a través de la cuantificación de proteínas de membrana y de secreción con los posibles cambios morfológicos y funcionales que se observan.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto diferenciador del Interferón- $\gamma$ , ácido retinoico y vitamina D3 en células del linaje mielomonocítico. Caracterizar los cambios fenotípicos producidos *in vitro* en estas células inducidos por diversos agentes inductores de la diferenciación.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar las concentraciones de IFN- $\gamma$ , AR y VD3 para inducir diferenciación de células de la línea celular mielomonocítica THP-1  
Obtener poblaciones celulares *in vitro* en diferentes estadios de diferenciación a partir de tratamientos con distintos inductores.  
Caracterizar fenotípica y funcionalmente estas poblaciones con respecto a:

- morfología
- proliferación
- expresión de enzimas hidrolíticas intracelulares como son la fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y b-glucoronidasa
- capacidad fagocítica como función efectora

## **HIPÓTESIS**

Al exponer las células del sistema fagocítico mononuclear THP-1 al tratamiento con los inductores de diferenciación, producirá poblaciones celulares homogéneas *in vitro* con características fenotípicas y funcionales distintas entre sí por encontrarse en diferentes estadios de diferenciación/maduración.

## **MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.**

### **Material de laboratorio.**

- **Probetas de 50,100 y 1000ml pyrex o Kimax**
- **Vasos de precipitados de 50 , 100 y 1000 ml Pyrex**
- **Pipetas graduadas de 10 ml y 5 ml**
- **Filtros de 0.22 $\mu$ m Millipore**
- **Matraces aforados de 100ml**
- **Matraces aforados de 1000ml**
- **Cajas de 96 pozos**
- **Cajas de siembra de 50ml y 100ml**
- **Tubos Eppendorf**
- **Porta objetos y cubre objetos**

### **Reactivos**

- **All-trans-ácido retinoico (Calbiochem)**
- **Interferón gamma (Gibco)**
- **Vitamina D3 (Calbiochem)**
- **Triton X-100**
- **Acetato de sodio**
- **Ácido acético**
- **Hidróxido de sodio**
- **Etanol**
- **Dimetil sulfóxido**
- **Suero fetal de bovino**
- **Fosfato de sodio**
- **Orto fosfato**
- **Ácido bórico**
- **Cloruro de sodio**
- **Cloruro de amonio**
- **Dodecil sulfato de sodio**
- **Medio RPMI rehidratado**
- **Bicarbonato de sodio**

- **Ácido clorhídrico**
- **Medio DMEM**

### **Equipos**

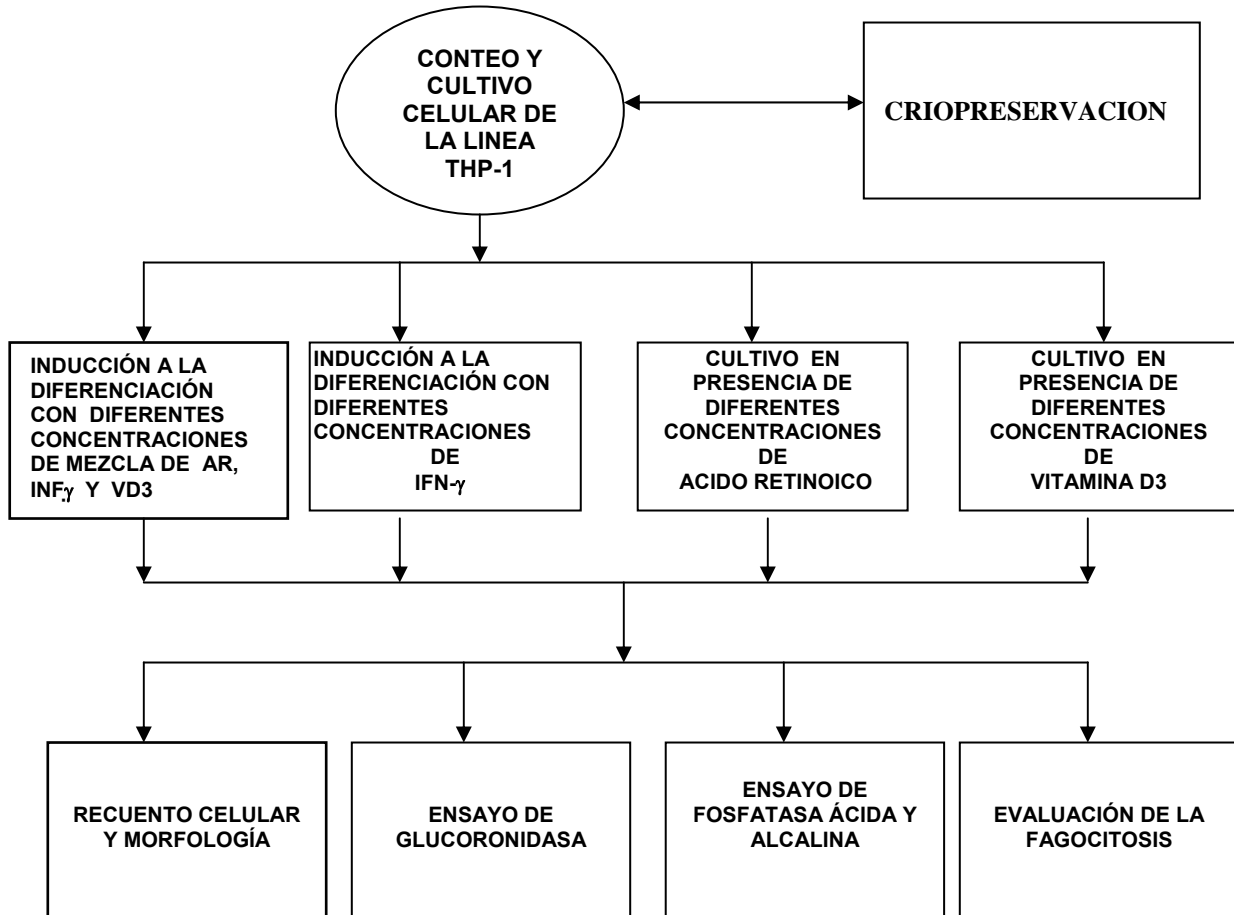
- **Lector de placas elx 800 BIO-TEK INSTRUMENTS. INC.**
- **Purificador de agua Marca Milli-Q academic.**
- **Centrifuga 5415C Eppendorf velocidad de 0 a 14 X1000min<sup>-1</sup>**
- **Centrifuga Clay Adam velocidad 0 a 100 rpm con medidor de tiempo**
- **Refrigerador Frilac a -4 C**
- **Refrigerador Nieto a -20 C**
- **Ultra congelador Rexo -70 C**
- **Estereoscopio American Optical objetivos 10x y 6.5x**
- **Microscopio Leica Dc100 objetivos 4x,10x, y 100x con cámara**
- **Estereoscopio Leica DMIL objetivos5x,10x,20x y 40x con filtros de luz 2555 y 1555 acoplado con camara softwer Leica Dc Viewer versión 3.1.0.0**
- **Computadora**
- **Incubadora marca Forma Scientific.**
- **Campana de cultivo de flujo laminar.**

### **MATERIAL BIOLÓGICO.**

- **Línea celular THP-1**

# METODOLOGÍA.

## DIAGRAMA DE FLUJO





## **CULTIVO CELULAR**

Las células THP-1 se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, 10mM Hepes, 2mM de L-glutamina, 100mg/ml estreptomina y 100U/ml penicilina, 10mM de aminoácidos no esenciales. Aproximadamente 20,000 células por mililitro de medio nutritivo suplementado, este valor puede variar según la caja y cantidad de células requeridas para los experimentos a desarrollar.

Después de la siembra, las cajas de cultivo son introducidas en una incubadora acondicionada con una atmósfera de 5% de bióxido de carbono, 95% de humedad saturante y 37 °C de temperatura.

Estos cultivos se revisan de cada 2 a 3 días para ver el desarrollo de las mismas y criopreservar o realizar los experimentos necesarios.

## **CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS**

Una vez que se ha logrado el cultivo seriado de células, es conveniente llevar a cabo su preservación a largo plazo mediante congelación, lo cual proveerá de un banco de células de diferentes tipos.

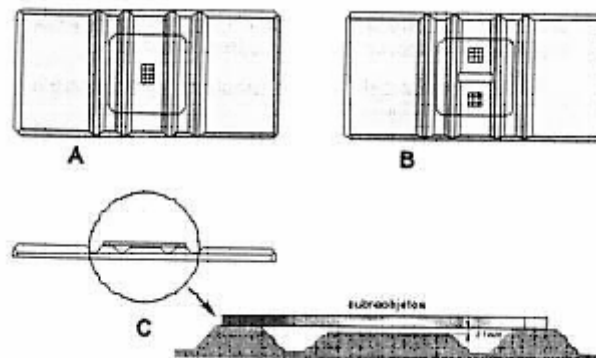
Realizando la congelación en viales de 1.8 ml de capacidad: para esto las células que se desean preservar son resuspendidas en un medio de congelación compuesto por suero fetal de bovino en una proporción del 90% y suplementado con 10% volumen /volumen de dimetil sulfoxido con un total aproximado de 1 a  $2 \times 10^6$  de células por mililitro. Colocar en el ultra congelador de  $-70$  °C durante por lo menos 12 horas para después colocar en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-170$ °C para preservar durante tiempo indefinido.

## INDUCCIÓN A LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.

Se ha reportado que diversos tratamientos son capaces de inducir diferenciación en líneas celulares de tipo mieloide. Entre ellos se puede mencionar al interferón- $\gamma$ , dihidroxi vitamina D3, ácido retinoico y dimetil sulfóxido (DMSO). Este proceso va acompañado de cambios morfológicos observables al microscopio, así como cambios funcionales, que incluyen entre otras la disminución de la proliferación, mayor capacidad fagocítica, incremento en el estallido respiratorio, así como una expresión aumentada de receptores para inmunoglobulinas (Fc), para corroborar y caracterizar la adquisición de distintas propiedades se evaluo:

## RECUENTOS CELULARES Y OBSERVACIÓN MORFOLÓGICA.

La cámara de Neubauer consiste en una placa gruesa de cristal en forma de porta, cuya porción central está dividida en tres bandas perpendiculares al eje longitudinal de la cámara. De ellas, las dos laterales se hallan sobreelevadas 0.1 mm con respecto a la central, y en esta última hay grabado un retículo cuadrangular. La banda central puede estar, a su vez, subdividida en dos semibandas idénticas y separadas por un surco paralelo al eje longitudinal de la banda. En cada una de estas dos semibandas hay grabado un retículo idéntico.



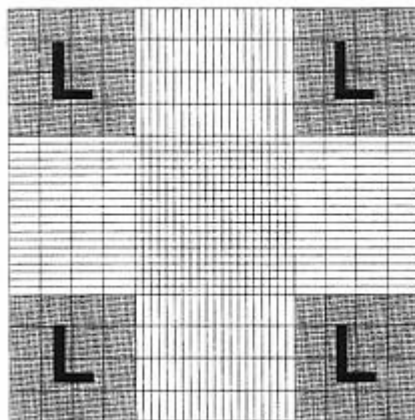
**Figura 4.**  
Camara de recuento de Neubauer

Lectura y ajuste de concentración celular: Como se contaron las células THP-1 presentes en 4 cuadrados grandes del retículo, se dividió entre 4 la cifra obtenida en el recuento, para calcular el número de células THP-1 que hay en 1 cuadrado grande.

Como la longitud de cada uno de los lados de los cuadrados grandes es de 1 mm, y la longitud del espacio comprendido entre éstos y el cubre es de 0.1mm; hay que multiplicar por 10 el resultado anterior, para determinar el número de células THP-1 existentes, no en 0.1mm<sup>3</sup>, sino en 1mm<sup>3</sup>.

En definitiva, para su cálculo puede emplearse la siguiente fórmula:

- $RL = L/4 \times 10 \times D$
- RL= Recuento de células THP-1 (número de células THP-1 por mm<sup>3</sup> de la suspensión celular).
- L = Células THP-1 contados en 4 cuadrados grandes.
- D= Factor de dilución



**Figura 5.**

En este mismo momento se observó la morfología celular y si hubo cambios aparentes como:

- 1.-Células en forma de huso
- 2.-Células adheridas a la caja

## **ENSAYO DE GLUCORONIDASA**

Se resuspendieron  $3 \times 10^6$  células / ml en Hanks completo, dichas células ya tratadas con los agentes diferenciadores, en placas de 96 pozos para cultivo celular, se colocaron 50  $\mu$ l de células por pozo utilizando tres pozos para INF- $\gamma$ , para ácido retinoico (A.R ), para vitamina D3 (VD3) y para sus combinaciones.

En tres pozos se les adicionó un control positivo de 50  $\mu$ l de PMA (forbol miristato) al momento de realizar el ensayo y tres pozos con células sin agentes, como blanco.

Se incubaron las células 2hr a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, después de las 2hrs, a uno de los pozos puesto por cada agente diferenciador, se le adicionaron 50 $\mu$ l de tritón al 2 % en H<sub>2</sub>O para lisar las células, se resuspendió y se liso durante 10 minutos antes de la determinación enzimática.

## **ENSAYO ENZIMÁTICO $\beta$ -GLUCORONIDASA.**

Se centrifugaron las células a 1500 r.p.m. durante 3min, se tomaron 45 $\mu$ l por pozo y se adicionaron en tres pozos vacíos de la misma placa de 96 pozos donde se hizo el tratamiento anterior para la determinación. Se agregaron 15 $\mu$ l de sustrato (p-nitrofenil $\beta$ -D-glucoronido), los lisados totales se resuspendieron previo a tomar la muestra y se añadieron 15 $\mu$ l de buffer de acetatos, se incubó a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> durante 2hrs; la reacción se detuvo con 150 $\mu$ l por pozo de NaOH a 0.2M y se leyó a 405 nm en lector de ELISA.

## **ENSAYO DE FOSFASA ÁCIDA Y ALCALINA.**

Se resuspendieron  $3 \times 10^6$  células/ml en Hanks completo ya tratadas con los agentes diferenciadores, en placas de 96 pozos para cultivo celular. Se colocaron 50 $\mu$ l de células por pozo utilizando tres para INF- $\gamma$ , para Ácido retinoico, para VD3 y para sus combinaciones.

A tres pozos se les adicionaron PMA como control positivo y tres pozos con células sin agentes, como blanco.

Se incubaron las células 2hrs a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, después de las 2hrs a uno de los tres pozos puestos por cada agente diferenciador se les adicionaron 50 $\mu$ l de tritón al 2% en H<sub>2</sub>O para lisar las células, se resuspendieron y lisaron 10 minutos antes de la determinación enzimática.

## **ENSAYO ENZIMÁTICO FOSFATASA ÁCIDA Y ALCALINA.**

Se centrifugaron las células a 1500rpm 3 min., se tomaron por cada pozo 25  $\mu$ l de y se adicionaron en tres pozos vacíos de la misma placa donde se hizo el tratamiento anterior. Para la determinación se agregaron 100 $\mu$ l de sustrato (p-nitrofenilfosfato) se incubó 2hrs. a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Para terminar la reacción se agregaron 125 $\mu$ l de NaOH 2N y se leyó a 405 nm en el lector de ELISA.

## **FAGOCITOSIS.**

Se resuspendieron  $3 \times 10^6$  células/ml en Hanks completo ya tratadas con los agentes diferenciadores como son INF- $\gamma$ , Ácido retinoico y VD3. Se agregaron 20  $\mu$ l de eritrocitos opzonizados, en placas de 96 pozos para cultivo celular teniendo un control negativo sin células ni agente diferenciador y solo con 20 $\mu$ l por triplicado de eritrocitos sin opzonizar.

Se incubó, a 37°C, en atmosfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, después de 2:30 hrs., se centrifugaron y se retiró el sobrenadante por inversión sin sacudir las placas, se agregaron 200  $\mu$ l de solución hemolisante a cada pozo y se incubaron nuevamente a 37°C en atmosfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, después de 2:30 hrs, se retiro la hemoglobina libre y se lavaron 2 veces con 200mcl de PBS (suero fetal de bovino). Posteriormente se lisaron las celulas con 10  $\mu$ l de SDS (dodecil sulfato) al 0.3% en PBS y se procedió a revelar con 20mcl por pozo de Diamino bencidina al 39%, incubando 30 min a temperatura ambiente y con agitación, se leyó a 490nm en el lector de ELISA.

## RESULTADOS.

Como paso inicial para la caracterización del efecto diferenciador de algunos agentes sobre células de la línea celular THP-1, uno de los primeros objetivos experimentales fue definir las condiciones con respecto a la concentración de cada uno de los agentes inductores de la diferenciación que tuvieran efecto sobre las células.

Se decidió seleccionar las concentraciones a emplear con base en efectos fácilmente observables, como cambios morfológicos y/o cambios en la velocidad de proliferación celular. Dichas propiedades fueron escogidas ya que se sabe que la diferenciación provoca cambios morfológicos y una disminución de la proliferación.

Para analizar el efecto de agentes diferenciadores tales como interferón gama (INF-gama), vitamina D3 (VD3) y ácido retinoico (AR) en el proceso de diferenciación de monocito a macrófago, se cultivo la línea celular THP-1, en presencia de INF-gama, VD3 y AR así como combinaciones de VD3/INF-gama, AR/INF-gama y AR/VD3.

Los cultivos celulares fueron observados al microscopio para detectar:

- a) cambios en la morfología
- b) disminución de la proliferación celular
- c) daño o muerte celular.

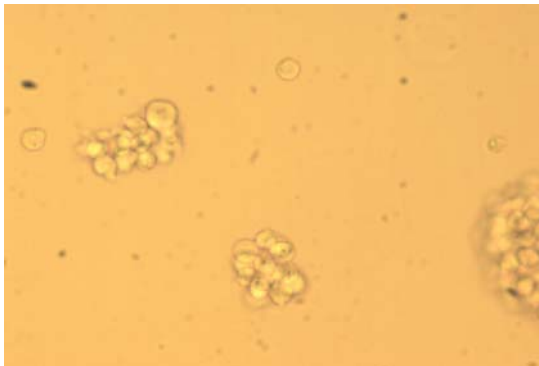
El AR y la VD3 inducen adherencia y cambios morfológicos muy evidentes aunque el AR induce cambios morfológicos desde el inicio del ensayo.

## DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE LOS DIFERENTES AGENTES.

Se realizó una cinética de inhibición de la proliferación inducida con  $\text{INF-}\gamma$ , incubando células THP-1 durante 24, 72 y 96 horas en presencia de 50, 100 y 200  $\text{UI}/\mu\text{l}$ . Transcurridos estos tiempos se realizó el recuento celular y la observación microscópica de los cambios morfológicos.

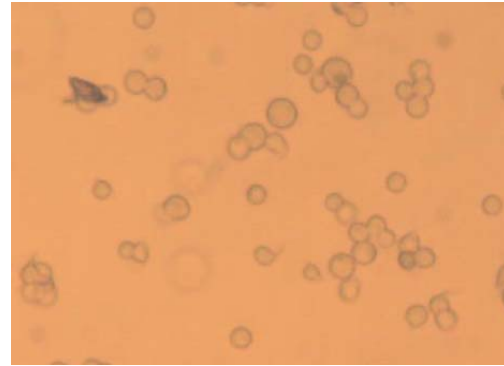
Cuando se utilizaron concentraciones mayores a 100  $\text{UI}/\text{ml}$  se observó mayor adherencia de las células a la superficie de cultivo y disgregación de los cúmulos celulares. (Fig 1). Al analizar la proliferación celular, se observó que no hay disminución muy evidente cuando se utilizaron 50  $\text{UI}/\text{ml}$ , sin embargo con 100 y 200  $\text{UI}/\text{ml}$  se observó una disminución de 50% en la proliferación celular a las 72 horas de cultivo. Después de este tiempo, a las 96 horas se incrementa de nuevo la proliferación celular. (Fig. 2) Es importante señalar que no hubo muerte celular debido a que se realizaron los conteos celulares en presencia de azul de tripano, para descartar esta posibilidad.

**Figura 1a**



Se observa la morfología de las células THP-1 sin ningún estímulo en grupos y esféricas.

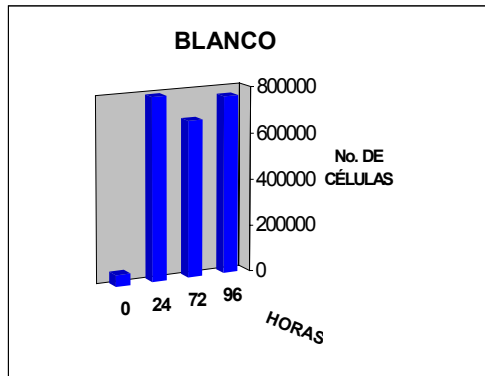
**Figura 1b**



Se observa la morfología de las células THP-1 con estímulo de  $\text{INF-}\gamma$  a 100 $\text{UI}/\mu\text{l}$  sin formación de grupos.

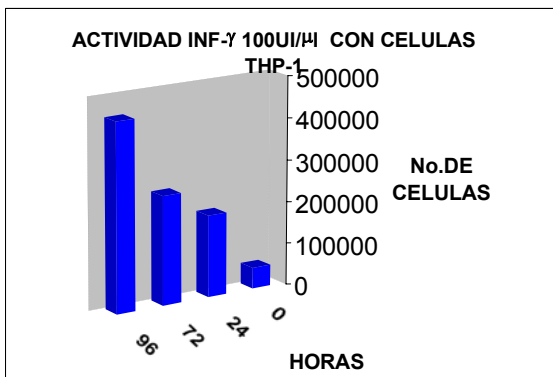


**Figura 2a**



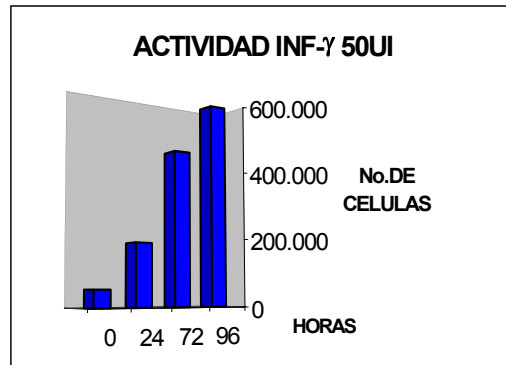
Se obtuvo el siguiente comportamiento de la línea celular THP-1 sin la adición de INF- $\gamma$  en medio RPMI.

**Figura.2c**



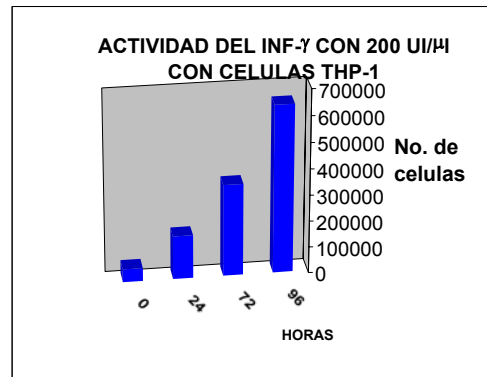
Se estimularon células con INF- $\gamma$  a (100UI/ $\mu$ l) se observó disminución de la proliferación celular, así como la separación de los grupos celulares.

**Figura 2b**



Al adicionar 50UI/ $\mu$ l de INF- $\gamma$  se observa un descenso de la proliferación celular continuando con una morfología esférica y en grupos.

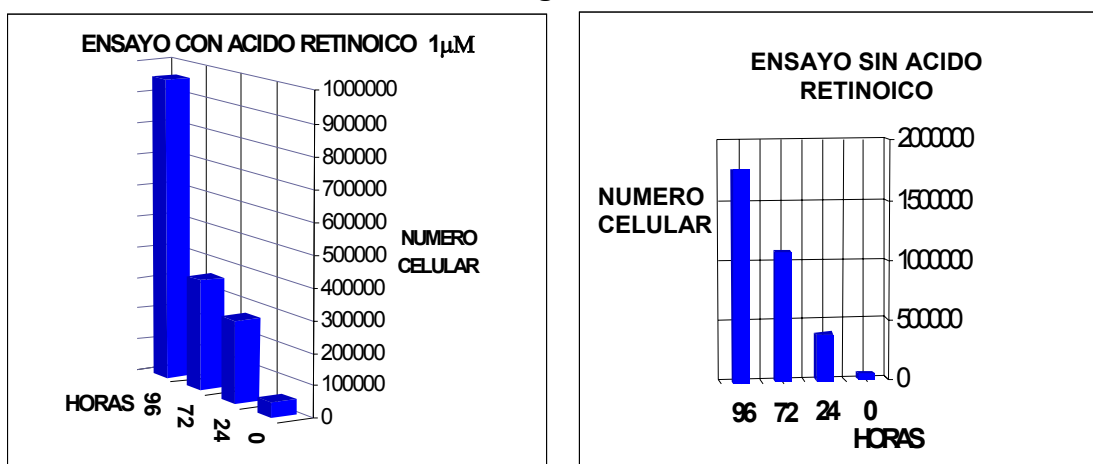
**Figura.2d**



Se estimularon células con INF- $\gamma$  a 200UI/ $\mu$ l se observó la disminución de la proliferación celular, pero no se observa la separación de los grupos .

Se evaluó el efecto de Acido Retinoico (A.R) utilizando una concentración de 100nM. Esta concentración se determinó en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega, y se observó que es suficiente para inducir la diferenciación celular. Se utilizó esta concentración para determinar el efecto en nuestras condiciones experimentales y también para determinar el efecto sobre la actividad enzimática. Al utilizar una concentración de 100nM de AR se observó una disminución en la proliferación celular a las 72 hrs como se muestra en la figura 3. Las células en presencia de ácido retinoico cambian su morfología y adherencia al sustrato de cultivo.

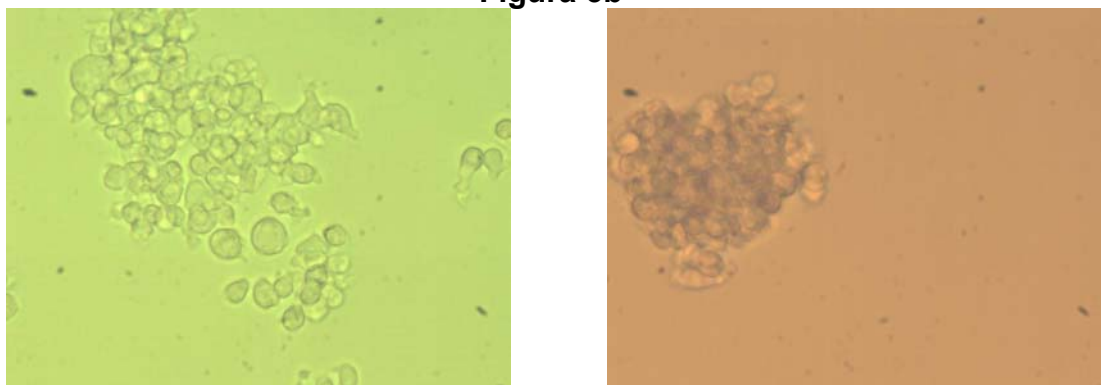
**Figura 3a**



Se observa una disminución de la proliferación celular así como la separación de los grupos en el primer día.

Se observa proliferación normal sin estímulo alguno.

**Figura 3b**

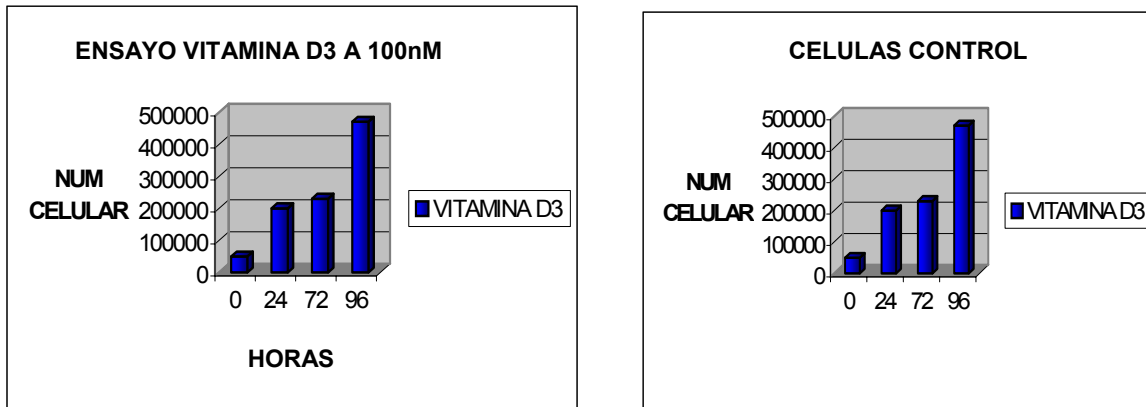


En la foto se presenta la morfología de células THP-1 estimuladas con Ácido Retinoico a un 1µM a las 72 horas.

En la foto se presenta la morfología normal de las células THP-1 a las 72 horas

También se evaluó el efecto de la vitamina D3 (VD3) utilizando una concentración de 100nM. Esta concentración se determinó en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega, y se observó que es suficiente para inducir la diferenciación celular. Se utilizó esta concentración para determinar el efecto en nuestras condiciones experimentales y también para determinar el efecto sobre la actividad enzimática.

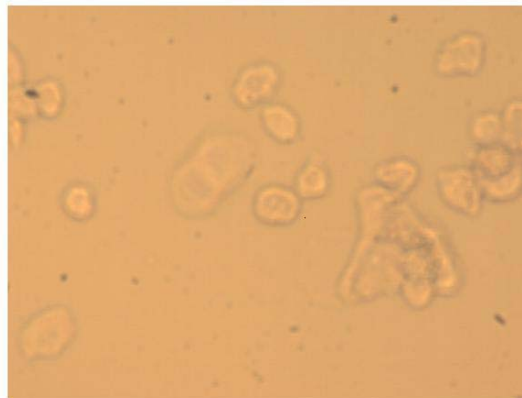
**Figura 4a**



Se observa disminución en la proliferación celular.

Células sin estímulo.

**Figura 4b**

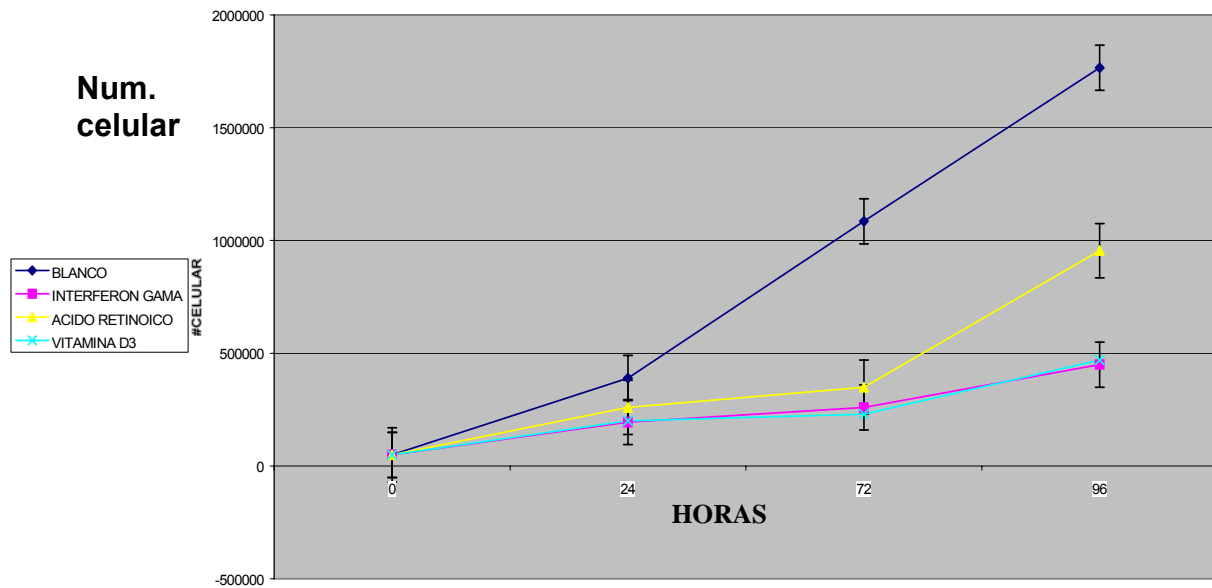


Células a las 72 hrs. con VD3.

Al tratar las células con Vd3 se observan cambios en la morfología a las 24hrs, disgregando los grupos. A las 72hrs se observa mayor número de células adheridas a la placa de cultivo.

# Efecto comparativo de los diferentes agentes sobre la proliferación celular

Figura 5



Como se puede observar en la figura 5, la vitamina D3 y el interferon- $\gamma$  son mejores agentes diferenciadores que el ácido retinoico.

## Efecto de los agentes diferenciadores sobre la actividad enzimática.

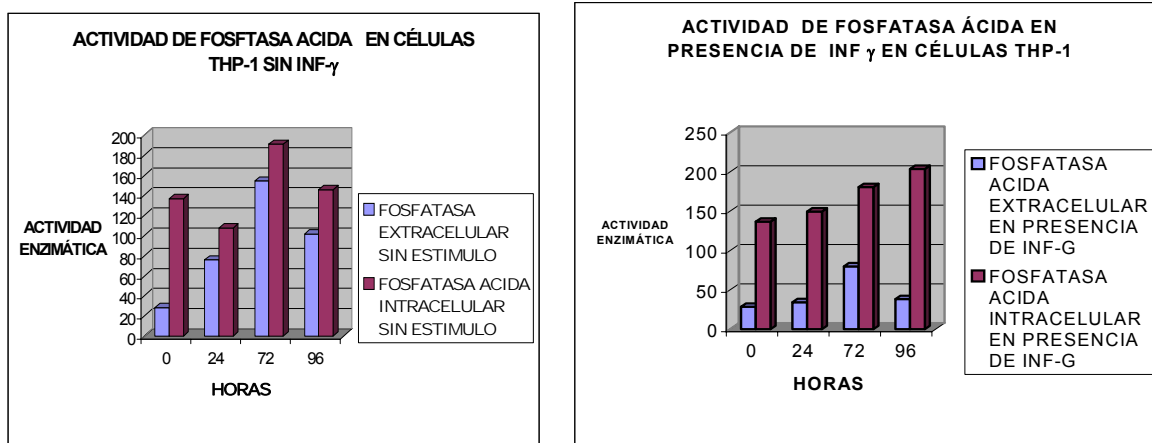
Otra de las funciones efectoras que aumentan durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos, es la actividad de las enzimas, por lo que se evaluó el efecto de  $\text{INF-}\gamma$ , A.R y VD3, sobre la actividad de las enzimas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -glucuronidasa.

### Efecto del $\text{INF-}\gamma$ sobre la actividad enzimática.

Para esto se incubaron células THP-1 en presencia de 100UI de  $\text{INF-}\gamma$  y después de diferentes tiempos se analizó la actividad de las enzimas fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -glucuronidasa.

El  $\text{INF-}\gamma$  induce una disminución en la actividad de fosfatasa ácida durante los tiempos analizados (Fig 6a). Por el contrario el  $\text{INF-}\gamma$  no tiene efecto sobre la actividad de la fosfatasa alcalina, aunque durante las primeras 72 hrs se observó un aumento en la actividad a las 96 hrs (Fig 6b).

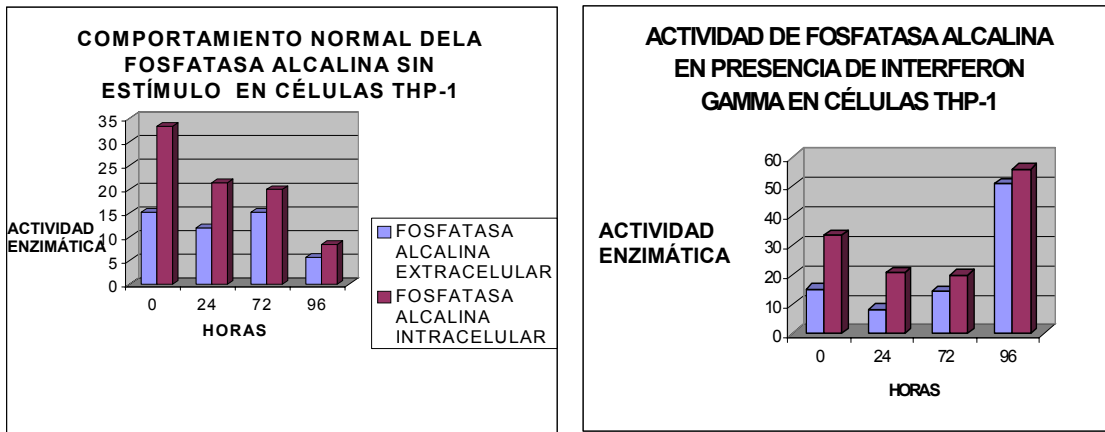
Figura 6a.



Se observa el comportamiento enzimático de la fosfatasa ácida sin estímulo alguno.

Disminución de la fosfatasa ácida con  $\text{INF-}\gamma$

**Figura 6b**



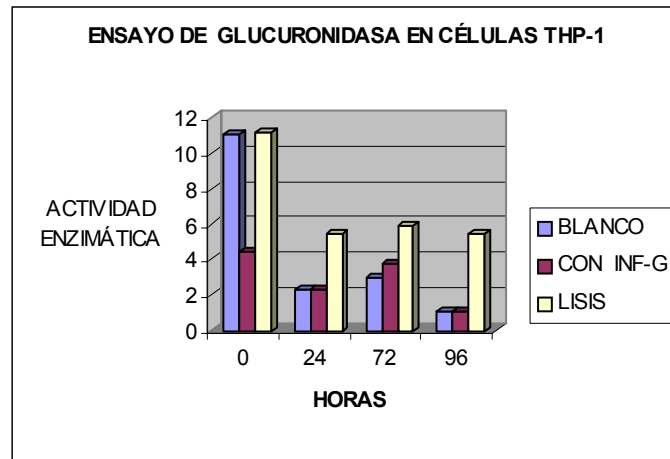
Comportamiento normal de la fosfatasa alcalina intra y extracelular sin estímulo alguno

No existe efecto del  $\text{INF-}\gamma$  en la fosfatasa alcalina durante las primeras 72hrs aunque se presenta un máximo a las 96 hrs.

En el caso de la  $\beta$ -glucoronidasa se observó una disminución de la actividad enzimática en presencia del  $\text{INF-}\gamma$ , siendo más evidente a las 96 hrs (Fig 6c).

**Figura. 6 c**

**ENSAYO DE  $\beta$ -GLUCURONIDASA.**



Se observa el comportamiento sin estímulo de  $\text{INF-}\gamma$  y con  $\text{INF-}\gamma$  para glucoronidasa extracelular e intracelular, viéndose un

incremento en la glucoronidasa extracelular en presencia de  $\text{INF-}\gamma$ .

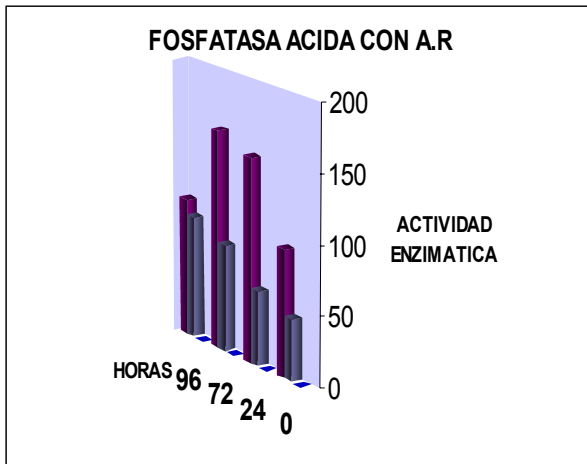
## **EFFECTO DE LA VD3, AR Y INF- $\gamma$ SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.**

Cuando se analizó el efecto de la VD3 sobre la actividad enzimática se observó que sólo se incrementó la actividad de la fosfatasa ácida a las 96hrs (Fig.8a). Por el contrario, disminuyó la actividad de la fosfatasa alcalina y de la  $\beta$ -glucoronidasa (Fig.8c y b).

En los resultados observamos que el ácido retinoico induce un aumento en la fosfatasa ácida intracelular a las 24 y 72 hrs (Fig 7a), también se analizó el efecto de la combinación de los agentes diferenciadores sobre la actividad enzimática. La combinación de AR/INF- $\gamma$  se observó un incremento en la actividad de fosfatasa ácida en comparación con la combinación VD3/INF- $\gamma$  (Fig 9a y b). El AR de lisados totales para glucoronidasa no presenta un incremento significativo, mientras que se ve un aumento mayor de glucoronidasa en combinaciones de VD3/INF- $\gamma$  (Fig 9c).

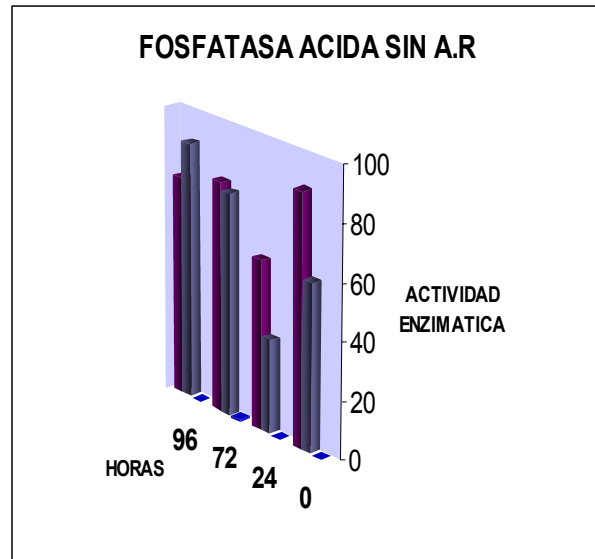
Se realizaron combinaciones de los agentes obteniéndose la diferencia entre cada tratamiento con ácido retinoico e interferón- $\gamma$ . Al realizar un estudio estadístico de análisis de varianzas se encuentra que al hacer la comparación entre ácido retinoico solo, ácido retinoico/interferón- $\gamma$  e interferón- $\gamma$  para fosfatasa ácida se obtiene una  $F_{2,6}$  calculada de 6.63 y una  $F_{2,6}$  de tablas de 5.14 por lo cual se deduce que existe una diferencia significativa entre los tratamientos puesto que se realizó la comparación por la misma prueba estadística para cada tratamiento con VD3, ácido retinoico e interferón- $\gamma$  obteniéndose una  $F_{2,6}$  calculada de 3.16 y  $F_{2,6}$  de tablas de 5.14 encontrando que no existe una diferencia significativa entre tratamientos.

Figura 7a



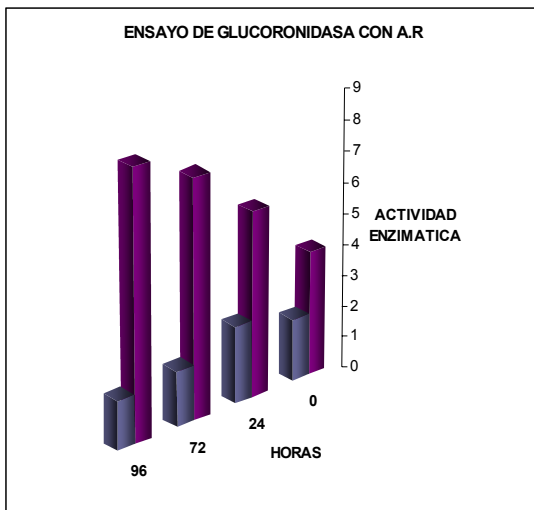
Se observa un aumento marcado de la fosfatas ácida intracelular con ácido retinoico a las 24 y 72 horas (barras color morado)

Figura 7 b



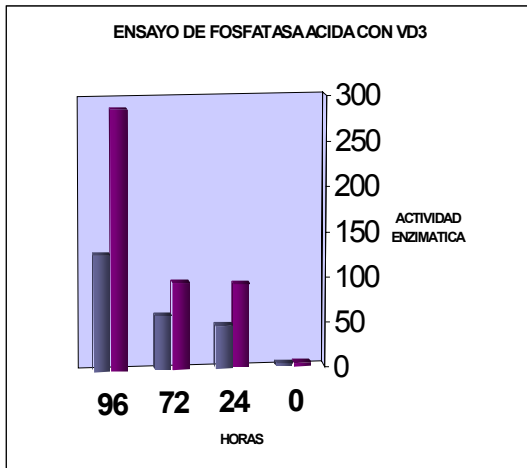
Se observa el comportamiento normal de la línea celular sin agente diferenciador.

Figura 7 c



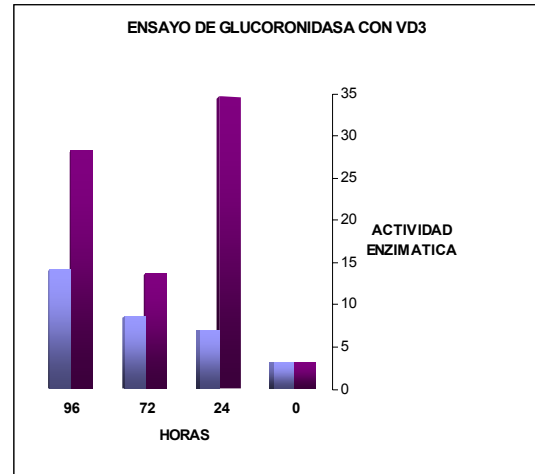
Se observa por las unidades que no hay un efecto en la glucoronidasa ni intra ni extracelular





**Figura 8a**

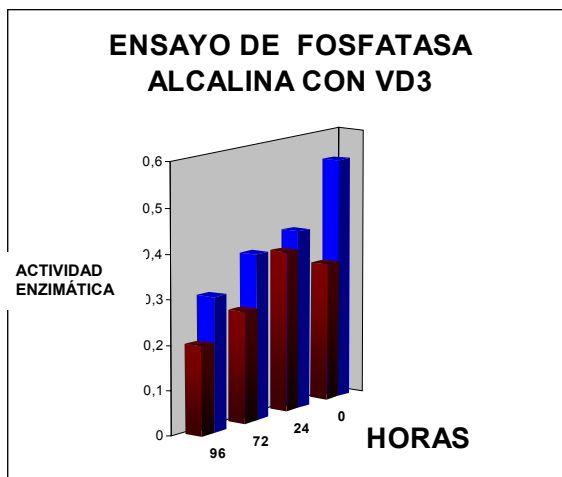
Se observa la cantidad de fosfatasa acida extracelular de la barra color azul y intracelular de color morado viendo un incremento en la intracelular con la adición de VD3



**Figura 8b**

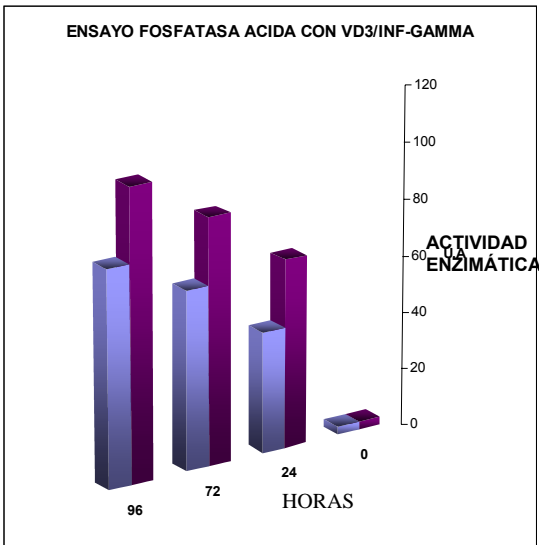
Se observa la cantidad de  $\beta$ -glucoronidasa extracelular barra color azul y intracelular barra color morado teniendo un aumento constante con la extracelular habiendo mas variación y aumento en la intracelular en presencia de VD3.

**Figura 8 c**



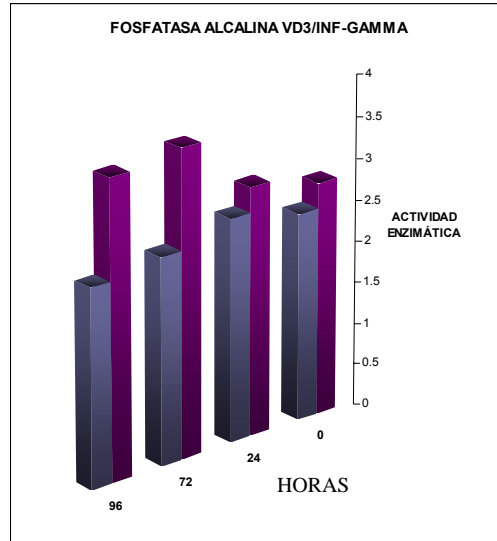
En fosfatasa alcalina intracelular( barra color azul) y extracelular (barra color vino) no se observa una gran diferencia en cantidades de las mismas observa una gran diferencia en cantidades de las mismas

**Figura 9b**



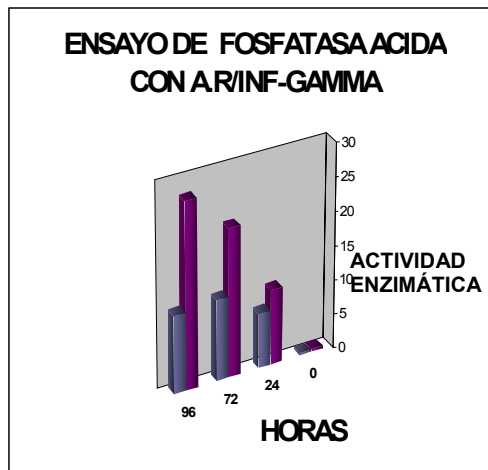
Se observa un incremento progresivo de la de la fosfatasa ácida intracelular. (Barras color moradas)

**Figura 9c**

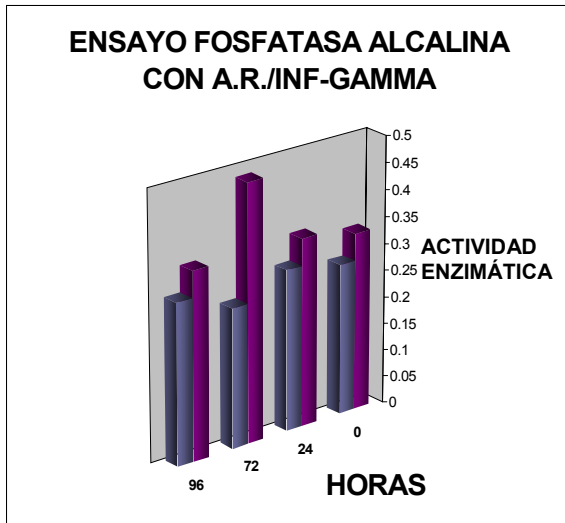


Se observa un ligero aumento fosfatasa alcalina intracelular (Barras color moradas)

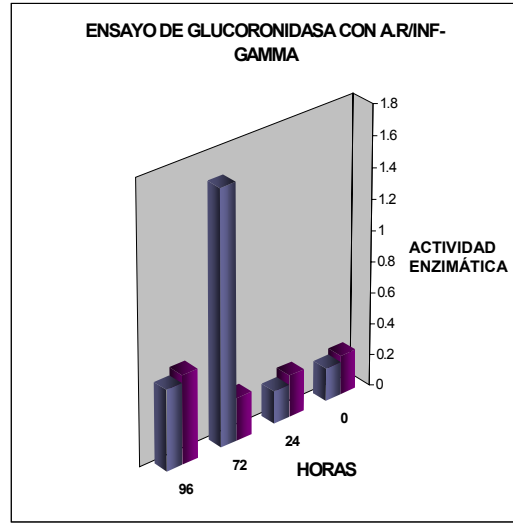
**Figura 9a**



**Figura 9e**

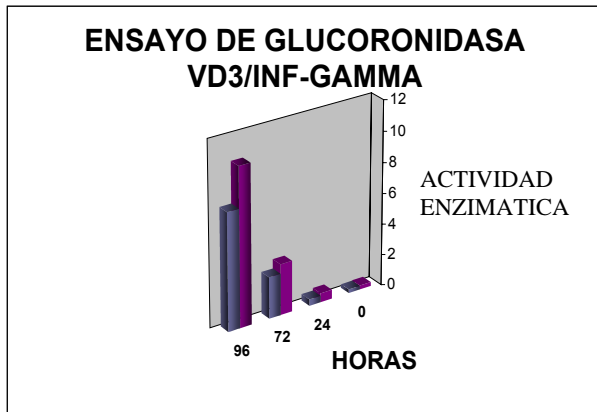


**Figura 9d**



Se observa un aumento en la presencia de fosfatasa alcalina intracelular (color morado) a las 72 hrs en presencia de ácido retinoico y  $\text{INF-}\gamma$

Se observa el incremento en  $\beta$ -glucuronidasa extracelular (color azul) a las 72 hrs en presencia de ácido retinoico y  $\text{INF-}\gamma$



En presencia de VD3 /  $\text{INF-}\gamma$  se observa un incremento significativo a las 96 hrs en la  $\beta$ -glucuronidasa intracelular (color morado).

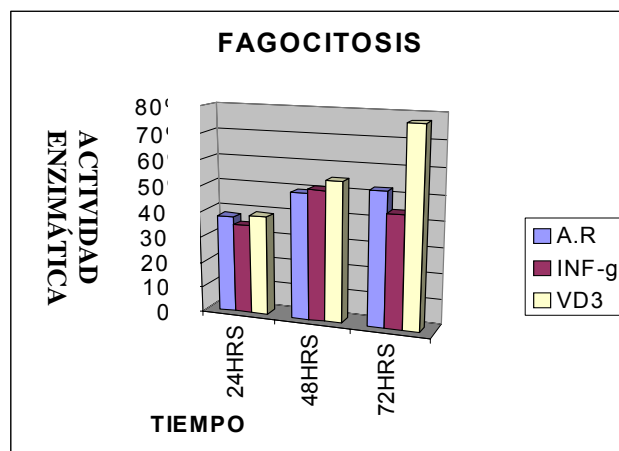
## EFFECTO DE AGENTES DIFERENCIADORES SOBRE LA FAGOCITOSIS

Durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago aumenta la actividad fagocítica, por lo que procedimos a evaluar el efecto de VD3, A.R e  $\text{INF-}\gamma$  sobre la fagocitosis en las células THP-1.

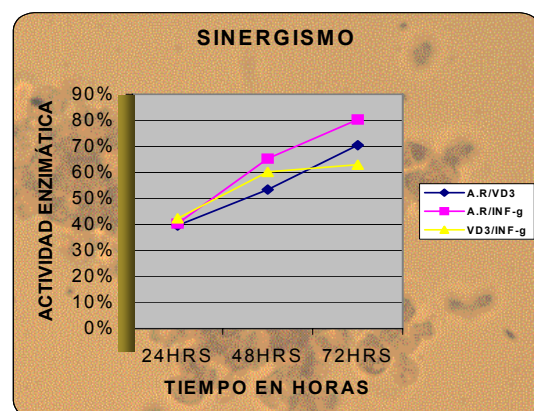
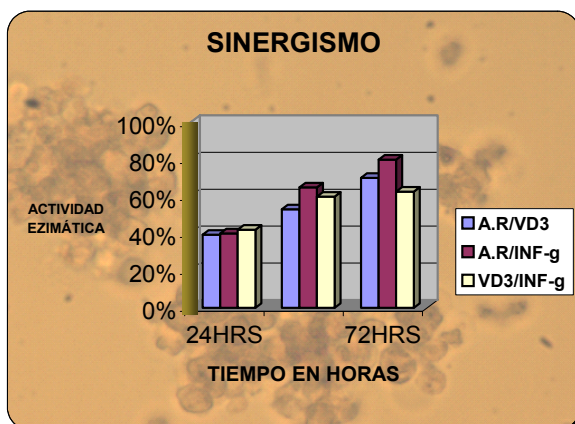
La vitamina D3 (VD3) induce un aumento en la fagocitosis que es muy evidente a las 72 hrs de tratamiento. El A.R y el  $\text{INF-}\gamma$  no tienen efecto muy evidente sobre la fagocitosis (Fig 10a)

Al usar la combinación de VD3/ $\text{INF-}\gamma$  disminuye la fagocitosis. Por el contrario a usar la combinación de A.R/ $\text{INF-}\gamma$  aumenta la fagocitosis.

Figura 10 a



Se observa el aumento de la fagocitosis al agregar vitamina D3



**Figura 10b**

Se observa el sinergismo en la fagocitosis con un aumento marcado al añadir ácido retinoico y interferon  $\gamma$

**ANALISIS ESTADISTICO.**

		fosfatasa ácida células sin lisar					
		TRATAMIENTOS			$\bar{\pi}$	$T^2_i$	$\Sigma T^2_i$
		ácido retinoico	ácido retinoico/INF-gama	interferón-gama			11.8
<b>DÍAS</b>	0	0.4413	0.03	0.285	0.7563	0.571	
	1	0.54	0.08	0.343	0.963	0.927	
	2	0.777	1.183	0.798	2.758	7.606	
	3	0.118	1.141	0.3825	1.6421	2.6961	
$T_j$		1.8769	2.434	1.8085	$T=6.119$		
$T^2_j$		3.522	5.924	3.27			
$\Sigma T^2_j$		12.716					
$\Sigma \Sigma X^2_{ij}$		4.7937					
$r=4$							
$c=3$							
$N=12$							
<b>FUENTE DE VARIACION</b>		<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>CUADRADOS MEDIOS</b>			
<b>ENTRE TRATAMIENTOS</b>		$12.716/4-6.119/12=2.669$	2	$2.669/2=1.3345$			
<b>ENTRE BLOQUES</b>		$11.8/3-6.119/12=3.423$	3	$3.423/3=1.141$			
<b>RESIDUAL</b>		RESIDUAL=1.809	6	$1.809/6=0.201$			
<b>TOTAL</b>		$4.7937-6.119/12=4.283$	11				
<p>POR LO TANTO SI COMPARAMOS CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS PARA VER SI EXISTE UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LOS VALORES ENTONCES TENDRIAMOS QUE CALCULAR F CALCULADA LA CUAL SERIA EL RESULTADO DE LOS CUADRADOS MEDIOS DE LOS TRATAMIENTOS ENTRE EL CUADRADO MEDIO DE LOS RESIDUALES.</p>							
<b>F CALCULADA</b>		<b>F DE TABLAS CON UNA PROBABILIDAD DEL 95% O UN ALFA DE 0.05</b>					
$F_{2,6} = 1.3345/0.201 = 6.639$		$F_{2,6} = 5.143$					
<p><b>POR LO TANTO F DE TABLAS ES MENOR QUE F CALCULADA CONCLUYENDO QUE EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE TRATAMIENTOS</b></p>							
<p>POR OTRO LADO SI COMPARAMOS LOS DIAS O SEA LOS BLOQUES ENTONCES TENDRIAMOS QUE</p>							
<b>F CALCULADA</b>		<b>F DE TABLAS</b>					
$F_{3,6} = 1.141/0.201 = 5.67$		$F_{3,6} = 4.757$					

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los cambios morfológicos, adherencia al sustrato, disminución de la proliferación celular e incrementos enzimáticos para fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y glucoronidasa, son cambios necesarios durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago para la fagocitosis y degradación de las partículas. Determinando la diferenciación celular en el caso de las células THP-1 estos cambios se han estudiado en líneas celulares mieloides leucémicas como; U-936, y HL60 que son líneas de características similares a las que usamos en este estudio, al adicionar agentes diferenciadores naturales como son el INF- $\gamma$ .

Para establecer las condiciones necesarias para observar los cambios mencionados anteriormente, se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de INF- $\gamma$ , observando a 100 UI/ml una disminución del 50% en la proliferación celular a las 72hrs de estímulo sin adherencia al sustrato, eliminando los grupos observados y mostrando células individuales, con respecto al control. Siendo unas de las características de diferenciación celular (Fig. 1b y Fig. 2b) la disminución de la proliferación.

Sin embargo la intensidad con que actúan los diferentes agentes diferenciadores varía según la línea celular y el agente utilizado. En el caso del ácido retinoico se utilizó la concentración de  $1\mu\text{M}$  la cual ya había sido utilizada, observándose la disminución en la proliferación, así como cambios morfológicos evidentes y adherencia al sustrato, esto debido probablemente al mecanismo de acción más estudiado y difundido que es por la interacción entre los glucocorticoides y su receptor intracelular (Fig. 3a y Fig. 3b). Los receptores de los glucocorticoides pertenecen a una superfamilia que incluye los receptores de hormonas tiroideas, vitamina D, ácido retinoico, y hormonas sexuales. Actúan como factores transcripcionales activados por el ligando (la hormona o vitamina correspondiente), alterando por diversos mecanismos, la transcripción génica. Se encuentran en todas las células nucleadas.<sup>30, 31</sup>

Al penetrar el ácido retinoico al interior de la célula, esto por su liposolubilidad, en el citoplasma se unen a su receptor específico en donde se dimerizan, y se traslocan al núcleo para ejercer su acción sobre el ADN, uniéndose a secuencias específicas de bases, denominadas Elemento de respuesta a receptores del ácido retinoico, de esta manera actúan sobre el gen promotor, e induciendo la síntesis de ARN mensajero. Este sale al citoplasma y es traducido en los ribosomas, formándose proteínas, que secretadas o permaneciendo dentro de la misma célula, constituye el brazo efector de la respuesta.<sup>32</sup>

El rol de los PPARs (Peroxisome proliferator activated receptors) en la regulación de la diferenciación celular y de la homeostasis lipídica. Estos receptores, activados por ligando, pertenecen a la súper familia de los receptores nucleares y son importantes en varias patologías como obesidad, diabetes y cáncer. Son el blanco de los proliferadores peroxisomales, un tipo de carcinógenos no-genotóxicos, tales como diversas drogas hipolipidémicas, plastificantes, herbicidas y otros contaminantes ambientales, y de antidiabéticos como las tiazolendionas.

Los PPARs son los miembros más recientemente descubiertos de la familia de receptores nucleares. Son activados por ácidos grasos y sus metabolitos (eicosanoides), y controlan una gran variedad de genes blanco envueltos en etapas clave del metabolismo lipídico y de la diferenciación celular. Se han identificado varios subtipos de PPAR en diferentes especies de vertebrados. Con base en el análisis del dominio de unión a DNA, altamente conservados, los PPARs han sido clasificados en la sub familia de receptores nucleares que incluyen al receptor de ácido retinoico (RAR), de la hormona tiroidea, y de los receptores huérfanos (sin ligando conocido). La familia de los PPARs está compuesta de tres subtipos, PPARa, PPARb y PPARg. Todos forman heterodímeros con el receptor de retinoides X (RXR). El PPARa modula la acción pleiotrópica de los proliferadores peroxisomales, regulando genes de la homeostasis lipídica, tales como los del metabolismo de ácidos grasos en mitocondrias, peroxisomas, y citocromo P450, la síntesis de apolipoproteínas, transporte intracelular de lípidos y supresión de la apoptosis. El PPARg afecta vías importantes en una serie de enfermedades, mediante acciones que median la diferenciación de

varios tipos celulares no relacionados. Estas incluyen adipocitos, hepatocitos, fibroblastos, miocitos, células de mama, epiteliales de colon, y macrófagos/monocitos. Poco se conoce aún de la función de PPARb.<sup>33</sup>

Se evaluó el efecto de la vitamina VD3, en las células THP-1 utilizando una concentración de 100nM la cual fue determinada, en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega, observándose una disminución en la proliferación celular de más del 60% con respecto al control, así como el gran cambio morfológico con células adheridas al sustrato y con formas de huso a las 72hrs (Fig. 4a y Fig. 4b).

Se ha observado que en humanos, el macrófago, en presencia de IFN-gamma, activa la 1-alfa hidroxilasa, que convierte el 15-hidroxicolecalciferol circulante en 1,25-dihidroxicolecalciferol (calcitriol o vitamina D3). A su vez, este calcitriol activa más al macrófago.<sup>35</sup>

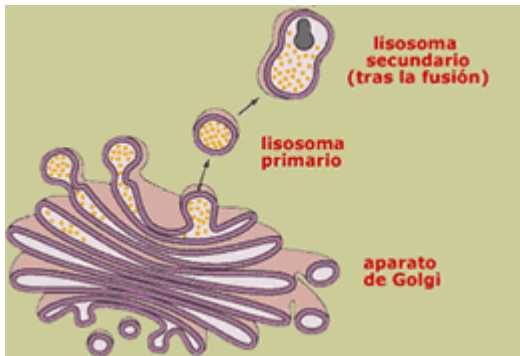
También se ha reportado que la 1,25VD3 puede inducir la diferenciación de monocitos de una manera dependiente del receptor de la vitamina D3, que incluye la activación de cinasas reguladas por señales extracelulares y las vías C-Jun-NH(2) y MAPK, las cuales regulan la expresión de PRB y otros factores para iniciar el proceso de diferenciación. En células HL60 se ha demostrado que una vía de señalización activada por la VD3 parece iniciar con la regulación de Egr1. Esta proteína es un factor de transcripción y su actividad es esencial para regular la expresión de proteínas relacionadas con la diferenciación de monocitos a macrófagos.<sup>36</sup>

En la célula existen enzimas hidrolíticas para la digestión intracelular controlada de macromoléculas; tal es el caso de las hidrolasas lisosomales (Cathepsina B, D-Glucuronidasa, hialuronidasa y fosfatasa ácida), proteinasas neutras (colagenasa, elastasa y activador de plasminogeno, lisozima y arginasa, dichas enzimas se encuentran dentro de vesículas membranosas llamadas lisosomas. Cuando las células monocíticas sufren un proceso de diferenciación, la actividad enzimática se incrementa.

Los lisosomas son de organelos especializados de forma redondeada o polimorfa que contienen diferentes tipos de enzimas



del tipo de hidrolasas ácidas (lipasas, nucleasas, proteasas, sulfatasas, fosfatasa). Como todas estas enzimas necesitan de un ambiente ácido para su funcionamiento óptimo, las membranas de los lisosomas disponen de bombas de protones que transportan de manera activa  $H^+$  hacia el lisosoma, manteniendo así un pH de 5.



**Figura 1.**

Los lisosomas reciben sus enzimas hidrolíticas lo mismo que sus membranas de la cara trans del Golgi (CTG). Ambos componentes llegan en vesículas diferentes, que poseen una cubierta de clatrina adquirida al desprenderse por gemación desde la CTG y que pierden poco después de su formación; las vesículas descubiertas se fusionan a continuación con los endosomas.



Los lisosomas no sólo intervienen en la digestión de macromoléculas, microorganismos fagocitados, desechos celulares y células, sino que también digieren organelos en exceso o envejecidos como las mitocondrias.

Las sustancias destinadas a la degradación dentro de los lisosomas llegan a estos organelos por una de tres vías posibles: a través de los fagosomas, de vesículas pinocíticas o de los autofagosomas.

El material fagocitado contenido dentro de los fagosomas se mueve hacia el interior de la célula; luego se une a un lisosoma o a un endosoma. Las enzimas digieren la mayor parte del contenido del fagosoma, sobre todo los azúcares y proteínas. Los lípidos, sin embargo, son más resistentes a la digestión, y se quedan encerrados dentro del lisosoma gastado, formando un cuerpo residual. Por su parte, los organelos envejecidos quedan encerrados en vesículas

llamadas autofagosomas, que se fusionan con endosomas o lisosomas y comparten el mismo destino que el fagosoma.<sup>3</sup>

En los resultados observamos que el INF- $\gamma$  por un lado induce aumento de la B-glucoronidasay por el otro una disminución en la actividad enzimática de fosfatasa ácida intracelular al estimular con INF- $\gamma$  esto parece indicar que existe una preparación de la célula para entrar a otra fase celular (Fig. 6 a).

La interacción celular con la matriz extracelular, con otras células y con factores solubles, activa cascadas de señales intracelulares que finalmente inducen la transcripción de genes previamente en estado quiescente. Esta capacidad de las células de percibir y responder a las señales de su entorno es un aspecto esencial de los sistemas biológicos. Su análisis ha ido revelando que *in vivo*, cada función biológica determinada es mediada por varias de estas señales, las cuales actúan de forma simultánea, secuencial, o ambas. A su vez, cada señal concreta puede inducir respuestas diversas en diferentes tipos celulares, sistemas biológicos o situaciones fisiológicas. La complejidad de esta respuesta, su pleiotropismo, su redundancia funcional y su especificidad se sustentan sobre la distribución tisular y lineal, tanto de los receptores como de la compleja maquinaria intracelular que transmite las señales entre éstos y el núcleo. Esta maquinaria constituye una auténtica matriz que permite transmitir la activación de un mismo receptor por diferentes vías, dispersando la señal y posibilitando de este modo su interacción y modulación recíproca con otras vías y señales. Además, permite la agrupación de múltiples señales procedentes de receptores y vías diferentes en efectores comunes, generando todo ello una respuesta final integrada y adaptada al estímulo o estímulos, y consistente normalmente en proliferación, diferenciación, activación funcional, supervivencia o apoptosis.<sup>34</sup>

El INF- $\gamma$  puede inducir diversas vías de señalización una de estas es la vía JAK-STAT. Uno de los rasgos más característicos de la vía JAK-STAT es su rapidez. Junto a la rapidez de su instauración, otro hecho remarcable de esta vía es el carácter transitorio de su señal. El ciclo completo de señalización dura de 1 a 4 h, incluso en presencia continua de IFN<sup>34</sup>.

El tratamiento con IFN fracasa en su habitual inhibición del crecimiento celular o en el establecimiento de un estado antiviral<sup>57,58</sup>. Y de forma aún más concluyente, el desarrollo de ratones transgénicos demostró que, in vivo, la pérdida de STAT1 produce un fenotipo caracterizado por fallo de la inmunidad antiviral mediada por los interferones de la inmunidad antibacteriana dependiente de los macrófagos activados por interferones, y que en consecuencia, estos ratones sucumben a exposiciones mínimas a agentes infecciosos<sup>34</sup>.

También se analizó el efecto de la VD3 sobre la actividad enzimática y se observó que se incremento la actividad de fosfatasa ácida a las 96 hrs (Fig.8 a) y disminuyó la actividad de la fosfatasa alcalina y una disminución de la  $\beta$ -glucoronidasa (Fig.8c y b).

En los resultados observamos que el ácido retinoico induce un aumento en la fosfatasa ácida intracelular a las 24 y 72 hrs (Fig. 7a) y en la  $\beta$ -glucoronidasa ningún aumento significativo (Fig.7c) esto debido posiblemente por un cambio en los niveles de ARNm para la formación de fosfolipasas y estando esta actividad en relación con la aparición de receptores nucleares RXR.

En estudios realizados en células dendríticas derivadas de monocitos se han detectado receptores nucleares (VDR) y se ha visto que el control de VD3 depende críticamente de la enzima 25-hidroxivitamina D3-1alfa hidroxilasa(1-alfa-OHase). A nivel mitocondrial el citocromo p450 de esta enzima cataliza la conversión de precursores 25-hidroxivitamina D3 inactivos a el metabolito activo con la adhesión de otro grupo hidroxilo.

Por tanto es posible que los efectos observados de la VD3 estén mediados por receptores nucleares de la vitamina D3.

Debido a que con los agentes utilizados de manera individual no observamos un proceso completo de diferenciación, decidimos utilizar una combinación de los agentes diferenciadores para determinar si era posible que las células THP-1 alcanzaran la morfología y funcionalidad de macrófagos, es decir que hubiera un efecto sinérgico estos agentes.

Se detectó una diferencia estadísticamente significativa en fosfatasa ácida y glucoronidasa y recuentos celulares, para poder confirmar que existe un sinergismo al aplicar el ácido retinoico e interferón- $\gamma$  al lograr una diferenciación celular en esta línea leucémica THP-1 es importante determinar el efecto de varios agentes diferenciadores para evaluar su participación en los procesos de diferenciación celular y poder establecer un modelo *in vitro* para analizar la función de diversas moléculas de superficie celular tal como los receptores para inmunoglobulinas en células diferenciadas y no diferenciadas.

Durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago aumenta la actividad fagocítica, por lo que procedimos a evaluar el efecto de VD3, A.R e INF- $\gamma$  sobre la fagocitosis en las células THP-1.

Es interesante mencionar que sin mezclar los agentes diferenciadores la fagocitosis aumenta con la vitamina D3 esto debido a que al aumentar las concentraciones tanto de VD3 extracelular, como intracelular, el cambio de 25(OH)VD3 que es convertida a 1 alfa 25(OH)VD3 sugiere que el proceso metabólico en las células THP-1 es altamente eficiente, al igual que las células dendríticas pues tanto macrófagos como células dendríticas demuestran una alta capacidad de expresar la enzima que provoca estos cambios en la VD3 y la relación de los VDR intracelular. En células dendríticas se ha observado una baja resolución de esta enzima, esto explica la relativa resistencia a la maduración de este tipo de células comparados con monocitos que inhiben los efectos de algunos ligandos aumentando sus receptores VDR y su regulación.

Al usar la combinación de VD3/INF- $\gamma$  disminuye la fagocitosis. Por el contrario al usar la combinación de AR/INF- $\gamma$  aumenta la fagocitosis siendo probable que cuando los agentes diferenciadores se combinan, sus mecanismos de acción pudieran no ser sinérgicos y en algunos casos podría anularse su efecto diferenciador, como en el caso de VD3 e INF- $\gamma$ .

## CONCLUSIONES

- El tratamiento con INF- $\gamma$ , a 100 UI/ml induce una disminución del 50% en la proliferación celular al 72hrs día de estímulo sin adherencia al sustrato, eliminando los grupos y observándose células individuales, sin cambios morfológicos evidentes con respecto al control.
- El tratamiento con ácido retinoico concentración de 1 $\mu$ M, induce una disminución en la proliferación, de más de 50% a las 96 hrs, así como cambios morfológicos evidentes y adherencia al sustrato.
- El efecto de la vitamina D3, en las células THP-1 utilizando concentraciones de 100 nM, induce una disminución en la proliferación celular de más del 60% con respecto al control, así como el gran cambio morfológico con células adheridas al sustrato y con formas de huso a las 72hrs.
- La actividad enzimática de fosfatasa ácida intracelular al estimular con INF- $\gamma$  se vio disminuida.
- La actividad enzimática de la VD3 se observó que se incrementó la actividad de fosfatasa ácida intracelular a las 96 hrs y disminuyendo la actividad de la fosfatasa alcalina y una disminución de la  $\beta$ -glucuronidasa.
- La actividad enzimática de fosfatasa ácida intracelular se ve incrementada a las 24 y 72 hrs y El AR de lisados totales para glucuronidasa no presenta un incremento significativo
- Se detectó una diferencia estadísticamente significativa en fosfatasa ácida y glucuronidasa.
- La VD3 induce un aumento en la fagocitosis de 10 veces mas a las 72hrs de tratamiento en las células THP-1

## **PERSPECTIVAS.**

Con el fin de completar el presente trabajo se dan las siguientes recomendaciones:

- La identificación de proteínas de señalización, así como proteínas de superficie para encontrar el mecanismo de acción de la VD3 en células monocito macrófago.
- Encapsulación en liposomas de la VD3 y mezclas con AR e  $INF\gamma$  para potenciar su efecto en esta línea así como poder dejar por mas de 24 hrs a exposición con luz UV para aplicarlos en medios de cultivo líquidos sin peligro de contaminación.
- Cuantificación de él RNAm por la formación de enzimas en esos momentos de la diferenciación.
- Validación de los métodos utilizados en este trabajo.
- Realizar estudios *in vivo*.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Abbas, A., Litchman, A. (). *Inmunología Celular y Molecular*. Ed. Interamericana. McGRAW-HILL 1995, 2da. Ed. pp. 272-278.
- 2) Aggarwal, B. and Gutterman, J. *Human Cytokines*. Ed Black well sci publications. 1992. 1-16
- 3) Jacques- Paul Borel, Randoux A, Cristian le, Maquart Fx , Valeyre J. (1987) *Bioquímica Dinámica*. Ed. Medica Panamericana. 1278- 1300.
- 4) Joost J Oppenheim, David L. Rosentreich et, al. *Cellular functions Immunity and inflammation*. Ed Arnold. Holland 1981. 127-155
- 5) Male, D. *Cytokines and cytokine receptors*, 2<sup>nd</sup> ed, Ed., Dirl Oxford University Press, pp 21-25
- 6) Reynoso, A. y Rojas, V . *Formulación de liposomas utilizando como núcleo griseofulvina*. UNAM. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, México D.F. Febrero 1997 pp18-21
- 7) Kevin S: C. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. Versión Electrónica ED 45, 1999
- 8) Villa. *Utilización de Liposomas como Acarreadores de las Citocinas IL-1 e INF gama Dirigidas Contra Poblaciones de Macrófagos de la Cavidad Peritoneal de Ratón*. Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo México 1998, pp 4-8
- 9) Soberon A G, Martuscelli Q J, Kumate Rj, Ruiz C M, et al. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 5<sup>a</sup> ed México , D.F. Editado por la Secretaria de Salud, 1988 653,858
- 10) Makishima M, Honma Y . *Ethacrinic acid and alpha,25-dihydroxyvitamin d3 cooperatively inhibit proliferation and induce differentiation of human myeloid leukemia cells*. *Leukemia Research* 1996 (20), 781-789  
dirección electrónica [www.bmn.com](http://www.bmn.com)
- 11) Schwend H, Fitzke E. et al. *Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-hydroxyvitamin D3*. *Jurnal Leukocitic Biology* 1996. (59), 555-561  
dirección electrónica [www.bmn.com](http://www.bmn.com) fecha de consulta 10/08/2003
- 12) Makishima, M Kanatani, Y Honma, et al. *Pharmaceutical composition for the treatment of leukemia containing 9-cis retinoic acid and alpha-tocopherol ester. patent in drugs* 1998.

- 13) Defacque H, Dornand J, Combes T, Cabane S et al. **Different combination of retinoids and vitamin D3 analogs efficiently promote growth inhibition and differentiation of myelomonocytic leukemia cell line.** *Journal of Pharmacology Experimental.* 1994,( 271), 193-199
- 14) **Autores desconocidos. Alpha is increased upon monocytic cell differentiation.** *Biochemistry Biophysiological Research.* United States 1996 ,(2), 315-322
- 15) McCaffery P, Dräger U. **Retinoic acid and the Developing Brain..** Eunice Kennedy Shriver Center  
Dirección electrónica: [www. PeterMcCarffery. com](http://www.PeterMcCarffery.com)
- 16) Chavez Cossio E, Celis Sandoval H, et al. **XXII CONGRESO NACIONAL Papel del ácido retinoico y Factores de la Familia de TGF Beta en la Activación de la Muerte Celular Embrionaria.** Cuervo Gonzalez R, Valencia Garcia C. Covarrubias Robles L. Departamento de Genética y Fisiología Celular. Instituto de Biotecnología. UNAM. editado por Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. pag 67
- 17) M. Corominas, V. Cardona. et al. **Expresión del Receptor de Baja Afinidad para la IgE (Fc RII/CD23) en los eosinófilos de pacientes asmáticos.** *Alergol Inmunología Clínica,* 2000 ,( 15), 310-316
- 18) Yuji Suematsu, Yoshiki Nihsizawa, et al. **Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Induction of Scavenger Receptor and Differentiation of 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Treated THP-1 Human Monocyte Like Cells.** *Journal of Cellular Physiology.* 2000.(165). 547-555.
- 19) A. Spittler, M. Willheim, F. Leutmezer. et al . **Effects of 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 and Cytokines on the Expression of MHC Antigens, Complement Receptors and other Antigens on Human Blood Monocytes and U937 Cells: Role in differentiation, Activation and Phagocytosis.** *Immunology.* 1997,(90), 286-293.
- 20) Laskin DL, Pendino KJ. **Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995,(35), 453-496
- 21) Ezekowitz **Uptake of Pneumocystis carinii mediated by the macrophage mannose receptor.** *Nature* 1991.(351), 155-158.
- 22) Wright SD **CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein,** *Science.* 1990,(249). 1431-1433
- 23) Allen LA, Aderem A. **Mechanisms of phagocytosis.** *Curr Opin Immunol* 1996.(8).36-40
- 24) Corominas M. Mestre M. Bas J. Buendia E. **Distinct modulation by interferon gamma (INF-g) of CD23 expression on B and T Lymphocytes of atopic subjects.** *Clin exp Immunol.* 1998,(112). 276-280.



- 25) Y. Wang, J. J. Zhang, W. Dai, W. Pike. **Production of Granulocyte Colony-Stimulating Factor by THP-1 Cells in Response to Retinoic Acid and Phorbol Ester is Mediated Through the Autocrine Production of Interleukin-1.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996,(225),639-646.
- 26) George boltz-Nitulesco, Martin Willheim. Et al . **Modulation of IgA, IgE and IgG Fc receptor expression on human mononuclear phagocytes by 1 alfa, 25 -dihydroxyvitamin D3 and cytokines.** *Journal of Leukocyte Biology*. 1995,.(58),256-262.
- 27) Valeria Bertagnolo, Luca Maria Neri, Marco Marchisio, et al . **Phosphoinositide 3 Kinase Activity Is Essential For all-trans-Retinoic Acid induced Granulocytic Differentiation of HL-60 Cells.** *Cancer Research*. 1999,(59),.542-546.
- 28) By Robert G, Van Buskirk. Et al. **Molecular Cell Biology.** *Cogito*. 1997, 200-280
- 29) Vincent T, Devita Jr, Samuel Hellman, Steven a. Rosenberg. **Cancer Principles and Practice of Oncology.** 5<sup>th</sup> ed. On CD-Rom. Ed. Lippincott-Raven. Pag 300- 380
- 30) Dahlman-Wright K, Wright A, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J. **Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids.** *J Biol Chem*. 1991 5;266(5):3107-12
- 31) Poon M, Liu B, Taubman M. **Identification of a novel dexamethasone-sensitive RNA-destabilizing region on rat monocyte chemoattractant protein 1 mRNA.** *Mol Cell Biol*. 1999 (10):6471-8.
- 32) Munck A, Mendel D, Smith L y col. **Glucocorticoid receptors and actions.** *Am Rev Respir Dis*, 1990;141:S2-S10
- 33) Herborg Hauksdóttir and Martin L. Privalsky. **DNA Recognition by the Aberrant Retinoic Acid Receptors Implicated in Human Acute Promyelocytic Leukemia.** *Cell Growth & Differentiation*. February 2001. (12) 85-98.
- 34) Rafael F. Duarteaa David A. Frankb. **La vía JAK-STAT de señalización intracelular y su repercusión en oncogénesis, inmunomodulación y desarrollo.** *J. Medicina Clínica* 2000. (114) - Número 6 . 227 - 234
- 35) Martin Hewison\*, Lisa Freeman†, Susan V. Hughes\*, Katie N. Evans\*, Rosemary Bland\*, Aristides G. Eliopoulos‡, Mark D. Kilby‡, Paul A. H. Moss† and Ronjon Chakraverty2,‡. **Differential Regulation of Vitamin D Receptor and Its Ligand in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells.** *The Journal of Immunology*, 2003,( 170): 5382-5390

**36) Fei Chen, Qing Wang, Xuening Wang and George P. Studzinski. *Up-Regulation of Egr1 by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Contributes to Increased Expression of p35 Activator of Cyclin-Dependent Kinase 5 and Consequent Onset of the Terminal Phase of HL60 Cell Differentiation.* Cancer Research, 2004, 64:5425-5433**