



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

---

---

**SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR:  
ASPECTOS GENERALES**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA**

**ADOLFO SÁNCHEZ CHOREÑO**

**ASESOR**

**QFB LADISLAO PALOMAR MORALES**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

U. N. A. M.  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Sistema fagocítico mononuclear: Aspectos generales**

Que presenta el pasante: Adolfo Sánchez Choroño

Con número de cuenta: 409022793 para obtener el Título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de mayo de 2013.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
<b>VOCAL</b>	Dr. Andrés Romero Rojas	
<b>SECRETARIO</b>	QFB. Ladislao Palomar Morales	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	

NOTA: los suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por darme la capacidad de poder llegar hasta este logro y por seguir poniendo en mi camino aún más metas que debo alcanzar. Además, le doy las gracias por darme la dicha de tener a mi lado a una gran familia, que sin duda han sido un factor más que importante para superar cada obstáculo. A mi padre, que con sus gritos y regaños, me ha enseñado que nunca hay que dejar de moverse y siempre seguir adelante sin importar nada, para así lograr ser un hombre de provecho, y sinceramente siento que nunca dejaré de aprender algo nuevo de ti papá; a mi madre, que sin dudarle, siempre me has dado lo mejor de ti, con tus cuidados, desvelos y con todo tu apoyo incondicional, papás creo que si sienten orgullo por mí, quiero que sepan que yo estoy más orgulloso de ustedes, porque con su amor han formado cuatro vidas, y a cada una le han dado una profesión; a mi hermanos, que con ustedes aprendí a jugar y ahora, puedo ver a través de sus experiencias y ejemplos, que para seguir adelante, hay que luchar y dar lo mejor de uno mismo. Realmente nunca dejaré de agradecer todas las bendiciones que he tenido hasta este momento, y por todas aquellas que aún me faltan por descubrir.

## **ÍNDICE**

Índice de figuras	
Índice de tablas	
Abreviaturas	
Objetivos	
Resumen .....	1
Introducción .....	2
<b>1. Sistema inmunológico</b>	
1.1. El sistema inmune y sus componentes celulares.....	5
<b>2. Sistema fagocítico mononuclear (SFM)</b>	
2.1. Definición de SFM e importancia .....	11
2.2. Desarrollo en la definición del SFM.....	12
2.3. Establecimiento del grupo celular que conforma al SFM	
Marcadores de superficie y progenitores mieloides .....	15
<b>3. Monocitos</b>	
3.1. Ontogenia y factores de crecimiento.....	21
3.2. Morfología de monocitos y sus precursores.....	24
3.3. Histoquímica de monocitos .....	29
3.4. Receptores de superficie de Monocitos-Macrófagos .....	30
3.4.1. Receptores para péptidos y mol. Pequeñas (receptoresFcYR).....	31
3.4.2. Receptores para complemento.....	32
3.4.3. Receptores tipo toll .....	32
3.4.4. CD14, CD16 y CD68 .....	35
3.4.5. CD11c/CD18.....	35
3.4.6. CD4 .....	36
3.4.7. Receptores para quimiocinas .....	36
3.5. Interacción de los Monocitos/Macrófagos con plaquetas y en la cascada de coagulación.....	38
3.6. Quimiotaxis y migración de monocitos.....	39
<b>4. Macrófagos</b>	
4.1. Diferenciación monocito-macrófago.....	47
4.1.1. Citocinas implicadas en la ontogenia de macrófagos .....	48
4.1.2. Macrófagos generados en presencia de GM-CSF y M-CSF.....	49
4.1.3. Fenotipo y función de los macrófagos M1 y M2.....	51

4.1.4. Activación de macrófagos (clásica y alternativa) .....	53
4.1.5. Características fenotípicas de los macrófagos activados .....	55
4.1.5.1. Uso de la expresión génica para el control del metabolismo celular como marcador de M1 y M2.....	57
4.2. Poblaciones de macrófagos en tejidos y su participación en la reparación tisular. ....	58
<b>5. Células dendríticas</b>	
5.1. Origen y tipos de células dendríticas (DC).....	64
5.2. Plasticidad funcional y variabilidad de linajes para la maduración de las DC .....	66
5.3. Características fenotípicas de las DC .....	69
5.4. Papel de las DC en la respuesta inmune .....	70
5.4.1. Tolerancia.....	71
5.5. Implicaciones terapéuticas.....	73
<b>6. Macrófagos asociados a tumores (TAM)</b>	
6.1. Origen de los macrófagos asociados a tumores .....	77
6.2. Estudios de expresión génica en diferenciación y activación de macrófagos .....	81
6.3. Expresión del Receptor de Folato- $\beta$ asociado a TAM y constituye un marcador de macrófagos anti-inflamatorios/reguladores M2 .....	82
6.4. La activina A previene la adquisición de marcadores anti-inflamatorios/M2 y direcciona la producción de citocinas por los macrófagos .....	83
<b>7. SFM en la aterosclerosis.</b>	
7.1. El monocito/macrófago como blanco terapéutico en la aterosclerosis.	85
7.1.1. Células espumosas .....	87
7.1.2. Metabolismo de lípidos en macrófagos .....	88
7.2. Control de la adhesión de monocitos como terapia .....	89
7.3. Relación entre hipercolesterolemia e inflamación. Importancia de mediadores inflamatorios .....	90
<b>8. Conclusiones</b> .....	91
<b>9. Glosario</b> .....	93
<b>10. Referencias</b> .....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Eventos principales que tienen lugar durante la inmunidad innata. ....	6
<b>Figura 2</b>	Eventos principales de RIA y generación de los diferentes tipos de LT.....	8
<b>Figura 3</b>	Ontogenia de monocitos, macrófagos y células dendríticas a partir de una célula progenitora cologénica común en médula ósea. ....	16
<b>Figura 4</b>	Tinción del antígeno F4/80 y de la proteína EGFP. ....	18
<b>Figura 5</b>	Diferenciación de monocitos, macrófagos y células dendríticas. ....	22
<b>Figura 6</b>	Diferenciación <i>in vitro</i> de monocitos ....	24
<b>Figura 7</b>	Tinción Wright de muestra de Médula ósea.....	25
<b>Figura 8</b>	Monocito en sangre periférica con tinción de Wright .....	26
<b>Figura 9</b>	Monocito con núcleo de forma circular .....	26
<b>Figura 10</b>	Microscopia de transmisión electrónica de barrido de un monocito.....	28
<b>Figura 11</b>	Vía de señalización del TLR en fagocitos mononucleares.....	34
<b>Figura 12</b>	Representación esquemática de moléculas estructurales de monocitos, de receptores y antígenos de superficie .....	37
<b>Figura 13</b>	Mecanismo de autoactivación de los receptores activados por proteasas (PAR) .....	41
<b>Figura 14</b>	La HSP60 como una molécula proinflamatoria.....	42
<b>Figura 15</b>	Las proteínas HSP60 y HSP70.....	42
<b>Figura 16</b>	Rodamiento, adhesión y transmigración de monocitos.....	44
<b>Figura 17</b>	Aspectos implicados en la heterogeneidad del sistema fagocítico mononuclear .....	47
<b>Figura 18</b>	Esquema ilustrativo de macrófagos generados en presencia de GM-CSF o M-CSF. ....	50
<b>Figura 19</b>	Tipos de activación de macrófagos.....	54
<b>Figura 20</b>	Propuestas de clasificación de macrófagos activados.....	55
<b>Figura 21</b>	Características fenotípicas y funcionales de macrófagos polarizados en función del estímulo de activación .....	56
<b>Figura 22</b>	Mecanismos involucrados durante la reparación tisular .....	62
<b>Figura 23</b>	Diferenciación de células dendríticas .....	69

<b>Figura 24</b>	Interacción entre macrófagos y células tumorales .....	78
<b>Figura 25</b>	Reclutamiento de monocitos a la masa tumoral .....	79
<b>Figura 26</b>	Mecanismo de reclutamiento de monocitos por la pared arterial y su diferenciación a macrófagos .....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	El Sistema Retículo Endotelial (RES) de Aschoff .....	13
<b>Tabla 2</b>	Características fenotípicas de Fagocitos Mononucleares.....	14
<b>Tabla 3</b>	Reacciones Citoquímicas de enzimas leucocitarias .....	30
<b>Tabla 4</b>	Receptores de superficie de fagocitos mononucleares.....	31
<b>Tabla 5</b>	Receptores TLR en mamíferos y sus ligandos .....	33
<b>Tabla 6</b>	Moléculas involucradas en el rodamiento, adhesión y trans migración de monocitos a través de células endoteliales.....	44
<b>Tabla 7</b>	Características fenotípicas y funcionales de macrófagos polarizados en función del estímulo de activación .....	52
<b>Tabla 8</b>	Marcadores de superficie de DC mieloides y plasmacitoides .....	65
<b>Tabla 9</b>	Antígenos tumorales potencialmente utilizables en inmunoterapia .....	75

## ABREVIATURAS

<b>AAM<math>\Phi</math></b>	Macrófago activado vía alternativa- $\Phi$
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>CAM<math>\Phi</math></b>	Macrófago activado vía clásica- $\Phi$
<b>CDP</b>	Precursor común de DC
<b>CLP</b>	Progenitor linfoide común
<b>CLR</b>	Receptor tipo lectina
<b>CMP</b>	Progenitor mielóide común
<b>DAMP</b>	Patrón molecular asociado a daño
<b>DC</b>	Célula dendrítica
<b>DCi</b>	Célula dendrítica inmadura
<b>DCm</b>	Célula dendrítica maduras
<b>DC-SIGN</b>	Molécula de adhesión intracelular específico de células dendríticas- no acoplado a integrina.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ECD</b>	Dominio extracelular
<b>EC</b>	Célula endotelial
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente aumentada
<b>FR-<math>\beta</math></b>	Receptor de folato- $\beta$
<b>G-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
<b>HSC</b>	Célula madre hematopoyética
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>HTLV-1</b>	Virus linfotrópico de células T Humano tipo-1
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intracelular
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IKDC</b>	Células Dendríticas asesinas productoras de Interferón
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>LC</b>	Células de Langerhans

<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>M1</b>	Macrófago tipo-1
<b>M2</b>	Macrófago tipo-2
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos
<b>MDDC</b>	Células dendríticas derivadas de monocitos
<b>MDM</b>	Macrófago derivado de monocito
<b>MDP</b>	Célula Progenitora de Macrófagos y Células Dendríticas
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>MP</b>	Progenitor mielóide con potencial de diferenciación restringido
<b>NFκB</b>	Factor nuclear-kappaB
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOD</b>	Dominios de oligomerización de unión a nucleótidos
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>RES</b>	Sistema retículo endotelial
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNS</b>	Especies de nitrógeno reactivas
<b>ROS</b>	Especies de oxígeno reactivas
<b>SCF</b>	Factor de célula madre
<b>SFM</b>	Sistema fagocítico mononuclear
<b>SMM</b>	Sistema monocito macrófago
<b>TAM</b>	Macrófagos asociados a tumores
<b>TAP</b>	Procesamiento antigénico
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante-β
<b>Th</b>	Linfocito T colaborador
<b>TLR</b>	Receptor Toll-like
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral-α

## **OBJETIVOS**

- Realizar una revisión de la información más reciente, sobre las funciones morfológicas, diferenciación, migración y activación de las células que conforman el SFM mediante una búsqueda bibliográfica, hemerográfica y electrónica.
- Documentar la relevancia que ha tenido el uso de técnicas histoquímicas y cultivos celulares para establecer los criterios de clasificación de las células que conforman al SFM.
- Describir la importancia del desarrollo de técnicas de diagnóstico e inmunoterapia sobre las células que conforman el SFM como blanco terapéutico y profiláctico en patologías como la arterioesclerosis y el cáncer.

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó mediante una búsqueda bibliográfica, hemerográfica y electrónica de información actual del Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), tomando como base la importancia en los avances de la comprensión en la ontogenia, morfología y funciones de las células que integran a este sistema, para hacer uso de este documento como una fuente de consulta útil y confiable para alumnos cursantes de la carrera de Bioquímica Diagnóstica, y todas aquellas relacionadas con las Ciencias Biológicas de la Salud.

Al mismo tiempo, se presentan algunas de las enfermedades en las que el SFM está involucrado, como lo es el cáncer y la aterosclerosis, en las que se ha observado que el SFM juega un papel fundamental en la patogénesis de ambas, al generar un ambiente inmunosupresor mediante la secreción de citocinas provenientes de macrófagos M2 intratumorales para el primer caso, y al promover la inflamación por parte de células dendríticas, acompañado de la formación de células espumosas a partir de monocitos reclutados al sitio de inflamación para el segundo caso, por lo que la generación de nuevas técnicas de diagnóstico, terapéuticas y profilácticas con el uso del SFM, representan prometedoras herramientas para el control de estas enfermedades

Además, se hace mención de la controversia que se ha generado en la clasificación de las células que forman parte del SFM, ya que los monocitos, macrófagos y las células dendríticas comparten numerosas características fenotípicas y funcionales, por lo tanto, las nuevas modulaciones farmacológicas que hacen uso del SFM deben de tener en cuenta los efectos que se generarán en la respuesta inmune del organismo al manipular las células que integran a este sistema, como lo es el caso de: la inhibición de adhesión de monocitos en las placas ateromatosas, el uso de Células Dendríticas (DC) como adyuvantes de respuesta antitumoral, la inducción de maduración de DC directamente en el tumor y la inhibición de la polarización de macrófagos M2 intratumorales.

## INTRODUCCIÓN

Los estudios modernos de los fagocitos mononucleares en mamíferos comenzaron con Elie Metchnikoff en el siglo XIX, siendo hasta finales del siglo XX que se desarrolló el término de “Sistema Fagocítico Mononuclear” (SMF). El entendimiento de la ontogenia, cinética y la función fagocitaria de estas células en animales llevaron al desarrollo de este concepto, conocido anteriormente como “Sistema Monocito-Macrófago” (SMM). El SFM constituye una población celular de gran importancia para el sistema inmunitario, y consta de células que tienen una estirpe común y cuya función abarca la fagocitosis y la presentación de antígenos. Las células que incluyen el SFM son todas aquellas derivadas de los precursores monocíticos de médula ósea (monoblasto y promonocito), monocitos de sangre periférica, macrófagos libres o alojados en distintos órganos y tejidos, y actualmente se ha incorporado a este grupo a las células dendríticas mieloides y plasmocitoides.

Los monocitos y macrófagos se encuentran dispersos por todo el cuerpo y son capaces de interactuar con células hospederas y partículas extrañas, para que, mediante su biosíntesis versátil y respuestas secretoras, mantengan la homeostasis fisiológica. Estas células están especializadas en la fagocitosis, motivo por el cual pueden estar presentes en circulación o en compartimientos de tejidos extravasculares, lo que las hace contribuir en diversas enfermedades hematológicas mediante la producción de productos bioactivos. Debido a su extensa heterogeneidad y plasticidad no se ha puesto profunda atención a estas células, pero la importancia del estudio de los monocitos abarca desde su maduración a macrófagos, hasta la relación que tienen con las células dendríticas, ya que estas dos últimas, son las principales células presentadoras de antígenos, interviniendo de esta forma en la defensa del organismo mediante la inmunidad innata y adquirida; además de su papel en otros aspectos como la inflamación, la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis, así como en el control de procesos infecciosos, tanto en el interior como en el exterior de los órganos linfohematopoyéticos. Por esta razón, los desórdenes que presentan las

células del SFM generan alteraciones significativas en el mantenimiento homeostático del organismo.

En la actualidad, se ha involucrado a las células del SFM en diversos estados patológicos; como lo es en la aterosclerosis, en la que los receptores *toll-like* (TLR) y receptores *scavenger* (SR) de los monocitos-macrófagos juegan un papel fundamental en la formación de células espumosas, y por lo tanto son las principales iniciadoras de placas ateromatosas. Además se ha observado que las DC también contribuyen en esta patología al generar una respuesta inmune local contra los antígenos oxLDL, amplificando la inflamación. Otro punto de interés son los macrófagos asociados a tumores (TAM), los cuales se han convertido en prometedores marcadores tumorales. Por lo tanto, el campo de estudio de estas células no solo se limita a la comprensión de las mismas, también son una ventana para poder generar una modulación farmacológica frente a diversos estados patológicos, por lo que contar con fuentes de consulta recientes, confieren una herramienta fundamental en el estudio e investigación del SFM.

# 1

## SISTEMA INMUNOLÓGICO



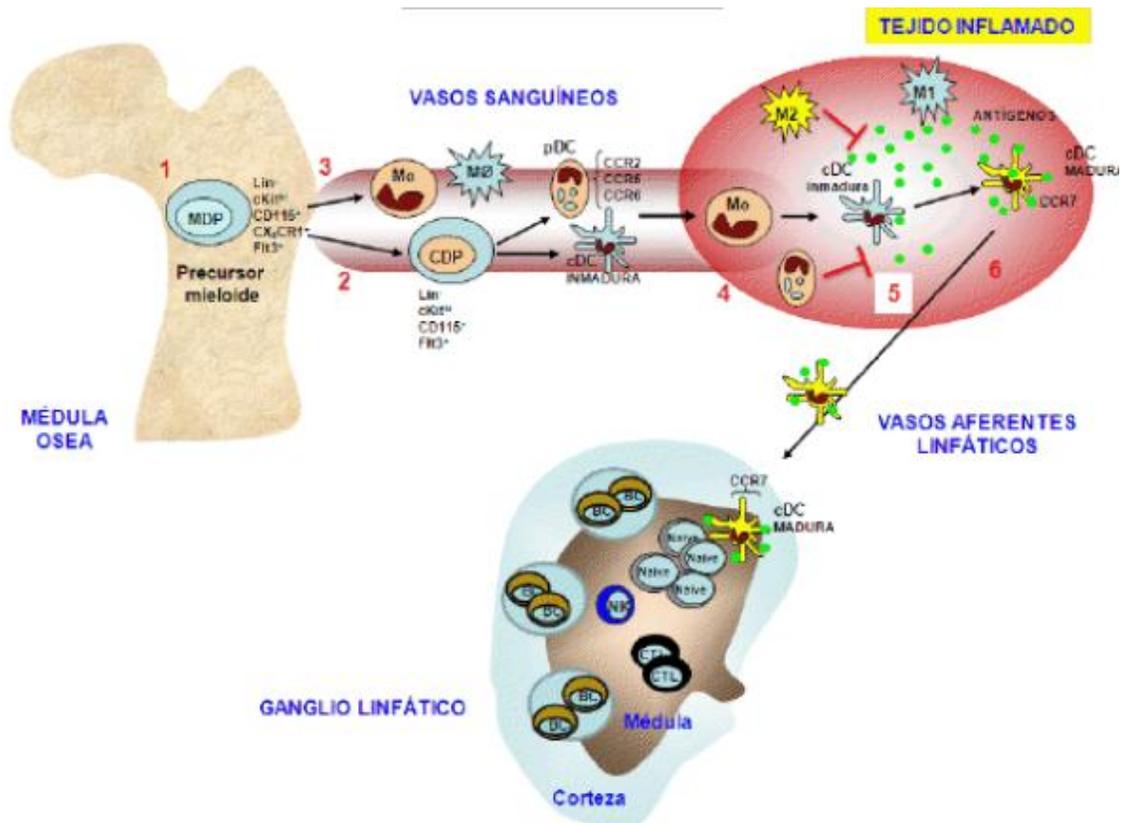
**(Paul Ehrlich, 1854-1915)**

### **1.1. El sistema inmune y sus componentes celulares.**

El sistema inmunológico tiene como principal función generar una respuesta global coordinada, tras la introducción de sustancias extrañas al organismo, para evitar el desarrollo de enfermedades. Para ser eficaz, este sistema debe detectar una gran variedad de patógenos y distinguirlos de las células-tejidos del propio organismo. En el humano, estos mecanismos de defensa son: externos e internos. Las defensas externas constituyen la primera línea de defensa contra patógenos y forman parte de la respuesta inmune innata (RII), estos mecanismos pueden ser de tres tipos: **físicos** (piel y mucosas), **químicos** (secreciones del organismo como; sudor, la lisozima de lágrimas y saliva, etc.) y **microbiológicos** (flora bacteriana autóctona). Cuando un agente extraño atraviesa la primera línea de defensa y penetra al organismo, se ponen en funcionamiento las defensas internas, que son la: Respuesta Inmune Innata (RII) y la Respuesta Inmune Adaptativa (RIA) (Sanchez, 2011).

La RII se caracteriza por ser una respuesta rápida y poco específica, ya que actúa directamente sobre el patógeno sin necesidad de selección o maduración celular y constituye la primera línea de defensa para limitar la infección tras la exposición a microorganismos o cualquier antígeno. Este sistema de defensa incluye componentes celulares como: células epiteliales, células dendríticas (DC), macrófagos, neutrófilos y células NK, además de moléculas del sistema del complemento y citocinas. Cada una de las células anteriormente mencionadas se encuentran equipadas con receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's), tales como: lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, DNA, glicolípidos, fragmentos de pared celular, etc. También los PRR son capaces de reconocer señales endógenas asociadas a daño tisular (DAMP) (Vega, 2008).

La RII es capaz de “activarse” únicamente frente a estas “señales de peligro” detectadas por los PRR de forma específica. A tal efecto, la inmunidad innata emplea principalmente a cinco familias de PRR: los receptores tipo Toll (TLR), los receptores lectina tipo C, los receptores de tipo NOD, los receptores de tipo RIG-1 (receptor de reconocimiento de patrones intracelulares) y los receptores scavengers (SR). De manera generalizada, en la Figura 1 se hace mención de los eventos principales en la inmunidad innata (Vega, 2008).



**Figura 1. Eventos principales que tienen lugar durante una respuesta innata. (1)** Las células mieloides se originan en médula ósea a partir de un precursor común, dando lugar a los distintos linajes de **(2)** DC y **(3)** monocitos/macrófagos. En respuesta a la inflamación o infección en un determinado tejido, estas células mieloides son movilizadas **(4)** hacia el sitio de inflamación donde son capaces de interactuar con el antígeno a través de los receptores TLR y **(5)** ejercer una primera línea de defensa. Las DC son capaces de migrar a ganglios linfáticos donde presentan estos Ag's a LT in expertos, siendo así la clave de la iniciación de RIA (Sánchez, 2011).

Las distintas familias de receptores difieren en el tipo de ligandos que reconocen, en su localización celular, en los mecanismos transduccionales que ponen en marcha al activarse y en las funciones celulares que regulan. Sin embargo, comparten una

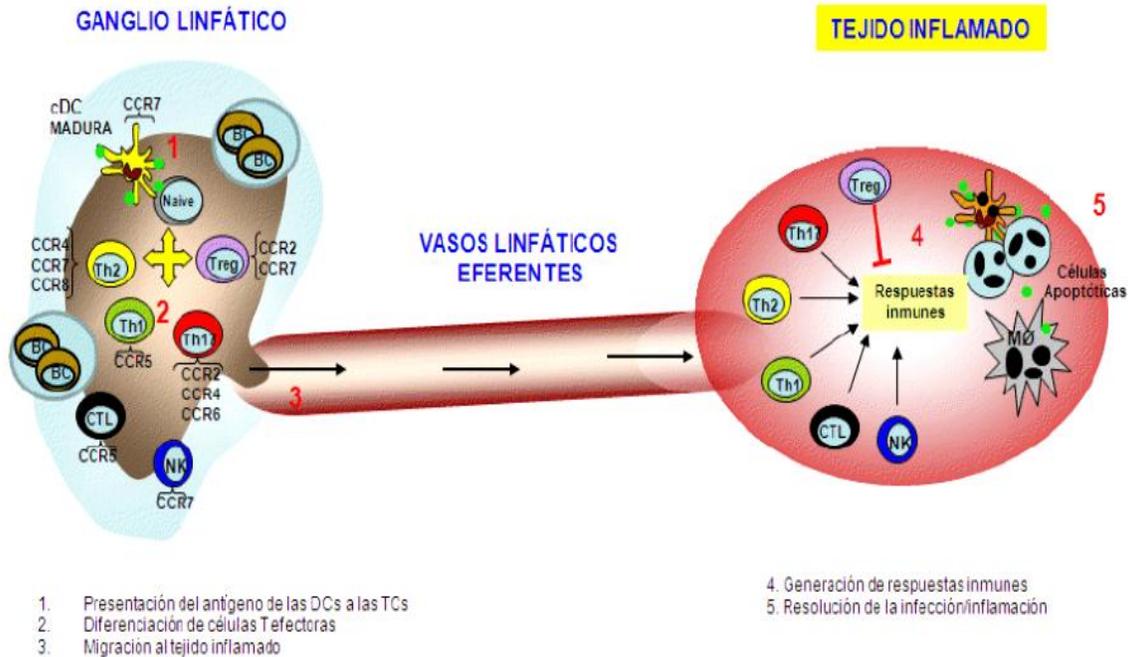
estrategia general: reconocen un conjunto discreto de motivos propios o indicativos de un proceso infeccioso o lesivo para el hospedero. Por lo tanto, definen una estrategia opuesta, y a la vez complementaria respecto de los mecanismos de reconocimiento propio de la inmunidad adaptativa, basada en el reconocimiento de lo particular mediante un universo inmenso de receptores antigénicos, expresados por células B y T (Goasgen, 2009).

De forma generalizada, y para su estudio se puede clasificar a la RIA en dos tipos: inmunidad humoral y celular, ambas actúan en conjunto con el fin de eliminar a los microorganismos, tumores y antígenos propios. La inmunidad celular esta mediada por dos subpoblaciones de linfocitos T (LT), los LT cooperadores (LT CD4<sup>+</sup>) y los LT citotóxicos (LT CD8<sup>+</sup>). Inicialmente los LT inexpertos por si solos no son capaces de identificar a los antígenos extraños, por lo tanto necesitan que les sean “presentados” (Goasgen, 2009). Para cumplir esta función de gran importancia, el sistema inmunológico consta de un grupo de células denominadas células presentadoras de antígeno (APC), dentro de las cuales se incluyen los macrófagos, linfocitos B (LB) y DC. Estas comparten la particularidad de que expresan en sus membranas MHC-I y MHC-II), a estas últimas se les asocia un péptido extraño y de esta manera lo pueden “presentar” a los LT inexpertos (Kelley, 2007).

Una vez efectuado el reconocimiento entre el LT inexperto y la APC, el LT se activa y se induce el perfil en uno de los dos subtipos de células T efectoras: LT CD8<sup>+</sup> o LT CD4<sup>+</sup>, tal y como se muestra en la figura 2. Dependiendo del microambiente celular y del tipo de APC que los activa, los LT CD4<sup>+</sup> pueden dar lugar a células tal y como se muestra en la figura 2:

- I) Th1; productoras de INF- $\gamma$  e IL-2 con las que activan propiedades microbicidas en macrófagos para así resistir infecciones intracelulares.
- II) Th2; productoras de IL-4, 5 y 13, que permiten reclutar a otros leucocitos y cooperar con LB para producir diferentes isotipos de Ig.

- III) Th17; productoras de IL-17 e IL-6, que movilizan a neutrófilos y fagocitos mononucleares para combatir infecciones.
- IV) T<sub>reg</sub>; algunas CD4<sup>+</sup> son inducidas a producir IL-10, diferenciándose a células CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, con capacidad de suprimir la función de Th1, Th2 y Th17 (González, 2010).



**Figura 2. Eventos principales de RIA y generación de los diferentes tipos de LT.** (1) En los ganglios linfáticos las APC presentan antígeno a LT inactivos, (2) estos a su vez se activan y diferencian a LT efectoras: Th1, Th2, Th17 o T<sub>reg</sub>. (3) Las células T cooperadoras y de memoria que se generan en este proceso, migran a través de los vasos linfáticos aferentes a los tejidos inflamados (4) para ejercer su función de regulación en la respuesta inmune o (5) en la protección frente a patógenos constituyendo así la segunda línea de respuesta inmune (Sánchez, 2011).

Los LT CD8<sup>+</sup> o citotóxicos, por otro lado tienen la capacidad de lisar a las células infectadas con microorganismos intracelulares, que no pueden ser eliminadas por los fagocitos. Los LT CD8<sup>+</sup> reconocen a los péptidos presentados sobre moléculas MHC-I, las cuales pueden ser expresadas por todas las células nucleadas. Una vez que el LT CD8<sup>+</sup> interactúa con el MHC-I y sus moléculas coestimuladoras, es activado y esto lleva a la exocitosis de sus gránulos, los cuales contienen perforinas y granzimas, provocando así la lisis celular. Los LT CD8<sup>+</sup> también expresan FasL, que interactúa con Fas en la membrana de las células blanco induciendo la apoptosis (Espinoza, 2005).

Una vez que se ha iniciado la respuesta inmunológica contra un antígeno, se generan anticuerpos y simultáneamente se producen LB de memoria, que facilitarán la respuesta inmunológica en posteriores exposiciones al antígeno. La respuesta inmunológica humoral consiste en la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas, la unión de anticuerpos a los patógenos para neutralizarlos, y la destrucción del patógeno unido al anticuerpo por parte de otras células inmunológicas a través de la opsonización y la fagocitosis. Los LB son activados por los LT Th2 para diferenciarse en células plasmáticas y producir anticuerpos. Los anticuerpos se producen en diferentes isotipos, en primera instancia IgM o IgG, y en posteriores estímulos IgA, IgD o IgE, que son distribuidos a diferentes áreas del organismo con diversos efectos. Una vez que el anticuerpo se une al patógeno, el receptor, en un fagocito, de la fracción cristalizable (Fc) se une al anticuerpo adherido al patógeno. Además, los anticuerpos pueden activar la vía clásica del sistema de complemento para destruir a los patógenos (Goesgen, 2009).

En resumen, el resultado final de la activación de las células de la inmunidad adaptativa es la producción de anticuerpos, la activación de mecanismos de citotoxicidad, la liberación de citocinas, la activación de otros tipos celulares, todos ellos conducentes a la remoción del antígeno, que de forma controlada y adecuada, permite la generación de memoria inmunológica y la inducción de una respuesta rápida y eficaz frente a posteriores retos con el antígeno (González, 2010).

# 2

## SISTEMA FAGOCÍTICO MONONUCLEAR (SFM)



*(Iliá Ilyich Mechnikov, 1845-1916)*

## **2.1. Definición de SFM e importancia.**

El SFM es un grupo celular conformado por: monocitos circulantes y sus precursores en médula ósea, macrófagos (M1 y M2) y DC (mieloides y plasmocitoides). Todas estas células comparten características morfológicas, funcionales y ontogénicas en común, razón por la cual se les considera como un sistema. El SFM tiene como principal función coadyuvar con el sistema inmunológico en la eliminación de agentes patógenos o de partículas extrañas a través de la fagocitosis. Además intervienen en el proceso de inflamación, reparación de tejidos, autoinmunidad y en el desarrollo de cáncer (Kaushansky, 2010).

Debido a su amplia heterogeneidad y plasticidad funcional, antiguamente era difícil definir a las células que integraban a este sistema, sin embargo con el desarrollo de

nuevas tecnologías el tema se ha ido clarificando (Granados, 2008). Además las funciones que tiene el SFM en el mantenimiento homeostático así como su participación en la patogénesis de distintas enfermedades ha hecho necesario profundizar el estudio sobre el SFM, abarcando desde la caracterización de sus propiedades fenotípicas y funcionales, hasta la incorporación reciente de las DC a este sistema; ya que las DC comparten propiedades con macrófagos, monocitos y sus precursores, y la importancia de esto es debido a que el nuevo uso de terapias involucra a todas las células que conforman al SFM (Castaño, 2010).

Uno de los temas en el que el SFM ha tenido gran impacto, es su participación en la progresión y mantenimiento de células cancerígenas a través de los Macrófagos Asociados a Tumores (TAM) y de las DC, ya que las citocinas y factores de crecimiento derivadas del tumor como: Interleucina 10 (IL-10), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), provocan un aumento en la generación de macrófagos y reducen la diferenciación de DC y, en consecuencia el sistema inmune contra células cancerígenas se ve afectado (Solinas, 2009). De esta manera, estas células han sido propuestas como un blanco terapéutico prometedor para la profilaxis e incluso detener la progresión y crecimiento de tumores (Allavena, 2008).

Otro punto de interés en el SFM es la patogénesis de la aterosclerosis. Durante mucho tiempo se sabía que los monocitos/macrófagos eran las principales células que estaban involucradas en la formación de placas ateromatosas, sin embargo, investigaciones recientes han descrito la participación crucial de los LT (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) y de las DC, considerando a estas últimas como principales iniciadoras de la aterosclerosis (Tian, 2009).

La participación del SFM no solo se limita a las enfermedades aquí mencionadas, hay que recordar que las células de este sistema pueden ser reservorio de agentes patógenos como virus, bacterias, hongos, etc. (Castaño, 2010). Además, hay que

considerar los trastornos que las mismas células de este sistema llegan a presentar en su morfología y función, las cuales son conocidas como histiocitosis. Por lo tanto, el campo de estudio sobre el SFM es bastante amplio y el conocer las características de las células que conforman a este sistema resulta fundamental para el desarrollo de nuevas terapias y métodos de diagnóstico contra múltiples enfermedades (Geissmann, 2010a).

## **2.2. Desarrollo en la definición de SFM.**

Inicialmente la definición de SFM se hizo para separar a las células de esta familia de las células linfoides (linfocitos T y B), granulocitos (polimorfonucleares) y de células endoteliales. En 1866, Metchnikoff fue el primero en observar el proceso de absorción y digestión de partículas extrañas mediada por células fagocíticas, clasificándolas en macrófagos (células grandes) y micrófagos (células pequeñas con capacidad fagocítica, ahora conocidas como neutrófilos), además mediante sus observaciones propuso que existía una estrecha relación entre los fagocitos que se encuentran dentro de órganos linfohematopoyéticos con los que residen en órganos no linfohematopoyéticos, razón por la cual introdujo el término “sistema macrófago” (Geissmann, 2010a). Posteriormente Aschoff en 1924, llevo este concepto aún más lejos, clasificando a diversas células del organismo en base a su actividad fagocítica, integrándolas en el “Sistema Retículo Endotelial” (SRE), (Tabla 1). En esta clasificación se tomaba a las células reticulares del bazo y nódulos linfáticos, así como las células retículo-endoteliales de los senos linfoides y sangre, como constituyentes estrictos del SRE, mientras que los histiocitos (macrófagos) y monocitos formaban parte de este sistema como constituyentes poco importantes. Con el tiempo, el concepto de SRE fue ampliamente criticado, e incluso considerado inapropiado, esto debido a que las células del endotelio vascular son funcional y morfológicamente diferentes a los histiocitos y más aún de células reticulares. También se comprobó que el llamado “aclaramiento” en el torrente sanguíneo se realiza principalmente por macrófagos del hígado (células de Kupffer) y por macrófagos que se encuentran en la pulpa roja de bazo, y no por células endoteliales o reticulares. Además el método utilizado por Aschoff para realizar esta clasificación se considera poco confiable, ya que se basaba en la absorción celular de

colorante vital, y por lo tanto, algunas células con baja actividad fagocítica (células endoteliales, fibrocitos, células reticulares, etc.) pueden teñirse como resultado final de la pinocitosis, especialmente cuando se aplican grandes cantidades de colorante (Chang, 2009).

**Tabla 1. El Sistema Retículo Endotelial de Aschoff.** Basado en la actividad fagocítica de colorante vital. \* **SRE** en sentido estricto, \*\* **SRE** en sentido más amplio (adaptado de Furht, 1972).

<p><b>Incremento de la Actividad Fagocítica</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Células endoteliales.</b></li> <li>- <b>Fibrocitos.</b></li> <li>- <b>Células reticulares de bazo y nódulos linfáticos*.</b></li> <li>- <b>Células retículo endoteliales de senos linfoides y sangre, incluyendo células kupffer*.</b></li> <li>- <b>Histiocitos**.</b></li> <li>- <b>Esplenocitos y monocitos**.</b></li> </ul>
---	--

Tiempo después se desarrolló el término “sistema retículo-histiocito” por Thomas, 1949, en el cual no solo se consideraba la capacidad fagocítica de las células, también se tomaba en cuenta la actividad metabólica de las células, por ejemplo, la elevada síntesis proteica considerada esencial para la proliferación y crecimiento. Pero ni el concepto de SRE o el de sistema retículo-histiocito proporcionaban un marco completamente satisfactorio. Por esa razón, en 1969, surgió una nueva clasificación tomando en cuenta morfología, función, origen, cinética celular y la capacidad de adherirse a superficies de vidrio, haciendo posible colocar a las células mononucleares altamente fagocíticas y sus precursores en un solo sistema, denominado "sistema fagocítico mononuclear" (SFM) (Tabla 2).

**Tabla 2. Características fenotípicas de Fagocitos Mononucleares.** Establecidas durante la conferencia de fagocitos mononucleares en Leiden, Países Bajos 1969. (+/-: presente o ausente, +: Escaso, ++: Moderado, +++: Elevado y ++++: Abundante, Vr: tamaño variable) (Adaptado de Kaushansky, 2010).

<b>Propiedades morfológicas y funcionales del SFM</b>				
	Promonocitos en Médula ósea	Monocitos en sangre periférica	Tejido	
			Macrófagos libres	Macrófagos residentes
<b>Diámetro celular</b>	14-20 µm	10-14 µm	10-25 µm	Vr

<b>Forma nuclear</b>	Plegado	Reniforme	Reniforme u oval	Reniforme u oval
<b>Nucléolos</b>	+	+	+	+
<b>Síntesis de DNA</b>	50-70 %	0-1 %	0.5-3 %	1.5-2.5 %
<b>Citoplasma</b>				
<b>C. Golgi</b>	Amplio	Menor	Vs	Vs
<b>Polirribosoma</b>	+++	+	+/-	+/-
<b>R.E.</b>	+	+	+	++
<b>Mitocondria</b>	+	++	++ a +++	++ a +++
<b>Lisosomas</b>	+	+	++ a ++++	++ a ++++
<b>Vesículas endocíticas</b>	+	+	++ a ++++	++ a ++++
<b>Propiedades funcionales</b>				
<b>Adherencia a vidrio</b>	+++	+++	+++ a ++++	+++ a ++++
<b>Pinocitosis</b>	+	++	+++	+++
<b>Fagocitosis</b>	++	+++	++++	++++

En la actualidad el SFM sigue desafiando a los sistemas biológicos celulares, debido a los sutiles límites entre los monocitos-macrófagos y otros tipos de células, derivados de su plasticidad fenotípica y trans-diferenciación, así como la prueba de la renovación de las poblaciones locales de macrófagos tisulares frente al reclutamiento de monocitos (Geissmann, 2010b).

Un claro ejemplo es la incorporación reciente de las DC al SFM (Geissmann, 2010b). Tras su descubrimiento en 1973 por R. Steinman, estas células fueron consideradas inicialmente como no fagocíticas, debido a que no cumplían con los criterios establecidos para los fagocitos mononucleares; se consideraban morfológicamente diferentes a cualquier célula del SFM y su origen no estaba totalmente definido, por lo tanto no podían ser parte del SFM, lo cual era erróneo. Con el tiempo, mediante el desarrollo de nuevas tecnologías inmunohistoquímicas, cultivos celulares y de biología molecular se comenzó a conocer más sobre las características funcionales, morfológicas y origen de las DC (Geissmann, 2010a).

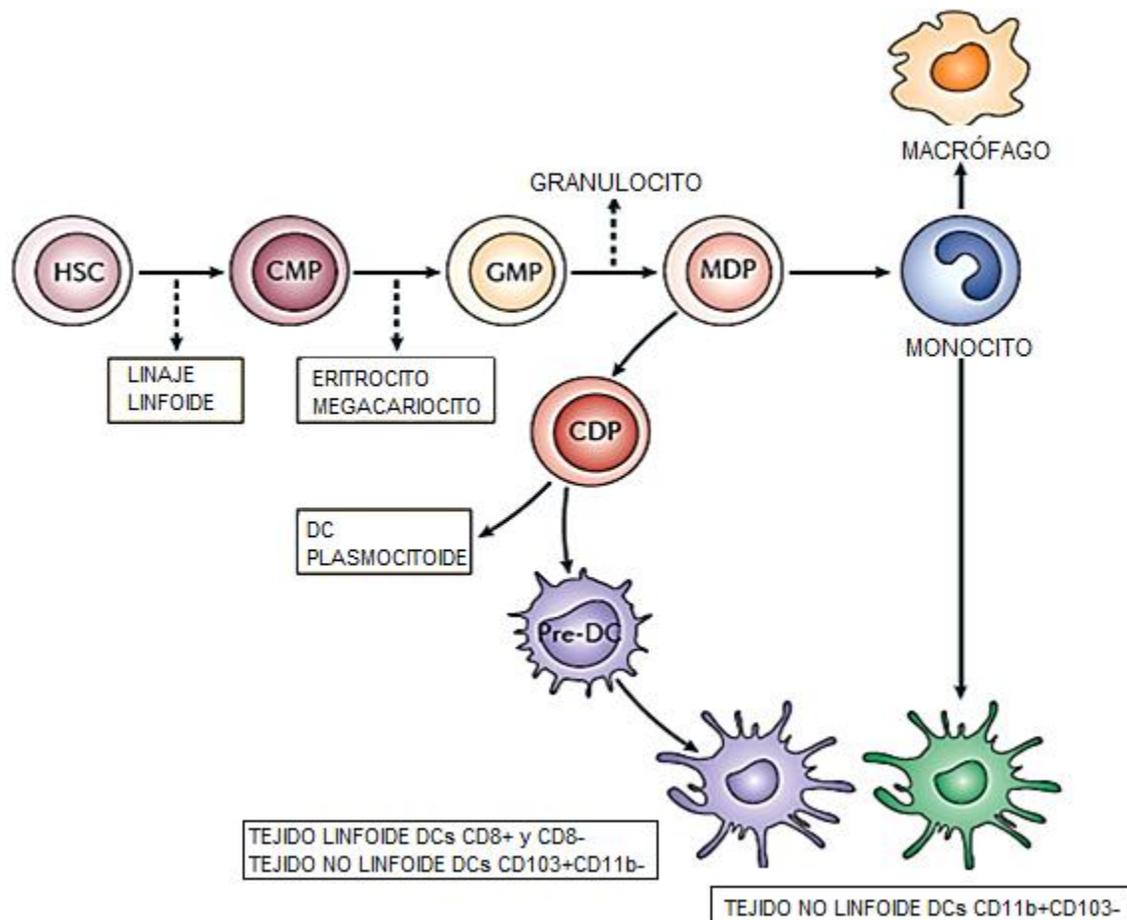
### **2.3. Establecimiento del grupo celular que conforma al SFM: Marcadores de superficie y progenitores mieloides.**

Se han realizado numerosos estudios que justifican la incorporación de las DC al SFM, empezando por la identificación de los factores de crecimiento implicados en el

desarrollo de las DC, además de la búsqueda de las células en médula ósea, torrente sanguíneo o en tejidos que están comprometidas en la conversión a DC (Chang, 2009).

Recientemente se ha resuelto parte de la ontogenia de las DC con la identificación de una célula progenitora común en médula ósea, llamada Célula Progenitora de Macrófagos y DC (MDP). Esta célula es la precursora de los monocitos de sangre, de los macrófagos tisulares y de las DC  $CD103^+CD11b^-$  ó DC  $CD103^-CD11b^+$  de diversos tejidos (Figura 3) (Chown, 2011 y Geissmann, 2010a).

En cuanto a los factores de crecimiento, la producción de los fagocitos mononucleares a partir de su célula progenitora es dirigida por: M-CSF (también llamado factor estimulante de colonias-1, CSF-1), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y el ligando para el receptor tipo tirosin-proteín cinasa (Flt3L), entre otros. Se ha observado que mutaciones en CSF-1 y CSF-1R en ratones producen una reducción significativa en poblaciones de DC y en sus presuntos precursores, razón por la cual se comenzó a relacionar su progenie con la de monocitos-macrófagos (Goasgen, 2009).



**Figura 3. Ontogenia de monocitos, macrófagos y células dendríticas a partir de una célula progenitora común en médula ósea.** La MDP puede dar lugar al CDP o monocitos. La CDP es un precursor común de las DC y a la vez puede dar lugar a DC CD8<sup>+</sup> o CD8<sup>-</sup> en tejidos linfoides, y a DC CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> en tejidos no linfoides y en sangre periférica. Además los monocitos pueden dar lugar a algunas DC CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> o a macrófagos. **HSC:** célula madre hematopoyética; **CMP:** progenitor mieloide común; **GMP:** progenitor de macrófagos y granulocitos; **CDP:** progenitor común de DC. (Chown, 2011).

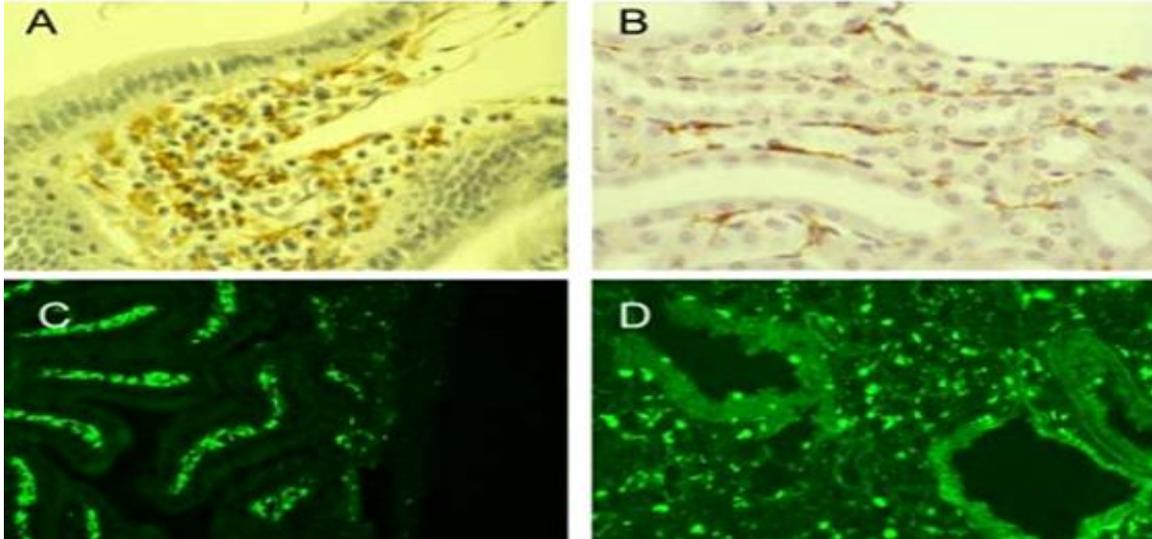
Un descubrimiento clave en el campo de las DC que ayudó a relacionarlas directamente con el SFM, fue la observación en cultivos celulares de que el GM-CSF (solo o en combinación con IL-4) promueve la proliferación-diferenciación de monocitos circulantes y de médula ósea en APC potenciales, las cuales pueden madurar aún más con estímulos, tales como productos microbianos (Hume, 2008). Este descubrimiento ha motivado diversos estudios en los que las células estimuladas con GM-CSF se asemejan a CD, y contrastan con las células estimuladas con CSF-1 (macrófagos) en términos de habilidad para presentar antígenos. Curiosamente, los estudios de la biología del macrófago se han realizado con células estimuladas con GM-CSF como un

modelo alternativo para el desarrollo de macrófagos. Lo anterior debido a que el CSF-1 se encuentra en circulación y en todos los tejidos *in vivo*, mientras que el GM-CSF se produce por estímulos con Lipopolisacáridos (LPS) o mitógenos de células T. En resumen, las células del SFM están expuestas durante su diferenciación y migración a distintos factores de crecimiento, como: CSF-1/IL-34, GM-CSF, IL-4, IFN- $\gamma$  y Flt3L, cada una contribuye a determinar el fenotipo celular. Las células crecen con cualquiera de estos factores y probablemente no tienen contrapartes *in vivo*, y no hay evidencia para identificar un factor de crecimiento que ayude a especializar la formación de DC, y por lo tanto sean excluidas del SFM (Ginderachter, 2008).

Geissmann F., Gordon S., Hume D. y Howat A. (2010) mencionan que otro punto de apoyo para el estudio de la relación entre las DC y las células del SFM ha sido el análisis de sus marcadores de superficie. Sin embargo, los rasgos fenotípicos de estas células han despertado mucho más confusión, de tal manera que se ha concluido que las DC son un linaje de los macrófagos o simplemente son un subconjunto de los mismos; tal y como sucede con los LT CD4<sup>+</sup>, que pueden diferenciarse en distintos subconjuntos (tales como LT cooperadores 1 (Th1), TH2, TH17 y T<sub>reg</sub>). Por lo tanto, los monocitos, macrófagos y DC también pueden diferenciarse en subconjuntos funcionales discretos. Además, se ha comparado la actividad de presentación de antígenos de las DC derivadas de monocitos humanos (cultivadas con GM-CSF) y de macrófagos derivados de monocitos (cultivadas con CSF-1), observando que ambos tipos de células se agruparon con LT inexpertos y formaron una sinapsis inmunológica (Silva, 2012).

Entre los marcadores de superficie recientemente estudiados se encuentran el F4/80 (considerado como específico para macrófagos), CD11c y CD11b (considerados como específicos para DC), sin embargo, diversos estudios han encontrado expresados estos marcadores en ambas células (Silva, 2012). Generalmente, se ha determinado que todas aquellas células que presentan niveles elevados de F4/80 en su superficie, son consideradas como macrófagos, mientras que aquellas que tienen bajos niveles de este marcador, se consideran como DC. Distintas observaciones indican que el antígeno

F4/80 se detecta fácilmente en las DC inmaduras, a pesar de que este disminuye en cuanto madura la DC. En la Figura 4, se muestran tinciones en las que se hace uso de los marcadores antes mencionados, con el fin de identificar las similitudes de las DC con los macrófagos en cuestión de morfología y su ubicación anatómica (Hume, 2008).



**Figura 4. Tinción del antígeno F4/80 y de la proteína EGFP. (A)** Lámina propia intestinal y **(B)** una sección de médula renal a partir de una tinción del antígeno F4/80 restringido para macrófagos (café). Note la morfología dendrítica y la extensión en el plano de la membrana basal del epitelio. **(C)** Pequeñas secciones de intestino y **(D)** de pulmón de ratones MacGreen en los cuales la EGFP es expresado a partir de la región promotora de CSF1R. En base a la localización, morfología y cantidad, es difícil sostener el argumento de que estos macrófagos son distintos de DC identificadas con base a CD11c en estas ubicaciones (Hume, 2008).

Muchos han considerado al CD11c como marcador específico de DC en ratones, pero la especificidad de este marcador depende del sitio anatómico donde se encuentre la célula y su expresión en células humanas resulta aún más compleja. En órganos linfoides las células mieloides que presentan niveles elevados o intermedios de CD11c, son consideradas como DC; sin embargo, en el pulmón, se han encontrado macrófagos con niveles elevados de CD11c, además en otros sitios fuera de los órganos linfoides, existen macrófagos que son CD11c<sup>+</sup> (Aghaallaei, 2010).

Por otra parte, se pensó utilizar al CD11b como un marcador universal, pero no específico, para macrófagos; sin embargo, se encontró que los macrófagos esplénicos son CD11b<sup>-</sup> o presentan bajas concentraciones de este marcador. Existe un grupo de

lectinas tipo C que parecen ser expresadas específicamente por DC, pero aún no hay suficiente información que confirme esta aseveración acerca de cualquier combinación de marcadores, especialmente en órganos no linfoides (Geissmann, 2010b).

Chown, A. y cols. mencionan que el gran problema al que se enfrentan los investigadores es que los estudios sobre marcadores celulares generalmente se realizan en tejidos linfoides, y por lo tanto, los marcadores convencionales (F4/80, CD11c, CD11b y MHC II) utilizados para identificar macrófagos y DC en humanos y ratones, han mostrado no ser específicos. Esto parece ser incluso más problemático en tejidos como el tracto respiratorio y el intestino, donde el ambiente es inmunológicamente diferente al tejido linfoide y no hay exposición constante al antígeno. Por lo tanto la amplia variabilidad y plasticidad del SFM se relaciona con las múltiples localizaciones anatómicas donde se encuentra. Cada una de las variables expuestas debe influir en la respuesta funcional de los fagocitos mononucleares como parte del SII y como moduladores del SIA. Finalmente es importante mencionar que el término CPA no se refiere a un tipo específico de célula, sino a una actividad (Castaño, 2010).

3

# MONOCITOS



*(Karl Albert Ludwing Aschoff, 1866-1942)*

### 3.1. Ontogenia y factores de crecimiento involucrados.

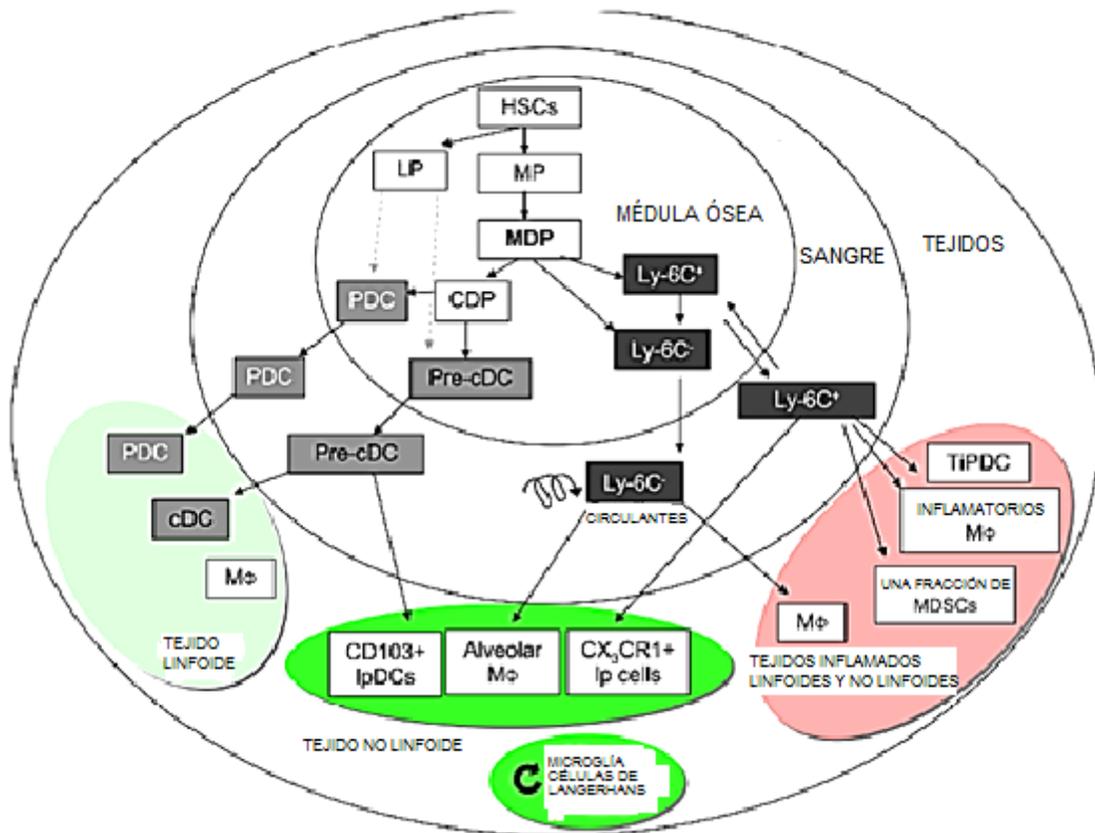
Los monocitos que circulan en torrente sanguíneo proceden de un precursor común de la médula ósea para monocitos, macrófagos y DC, el MDP con un fenotipo característico  $\text{lin}^- \text{c-kit}^+ \text{CD115}^+ \text{CX3CR1 Flt3}^+$ . Una vez generados los monocitos se liberan al torrente sanguíneo, donde constituyen un 10 % de los leucocitos circulantes en humanos. Los monocitos de sangre periférica tienen una vida media relativamente corta (24 a 72 horas), y contribuyen a la renovación de los macrófagos y DC tisulares (Silva, 2012).

El uso de la hibridación fluorescente *in situ* multicolor (M-FISH) ha permitido la identificación de los progenitores y de las poblaciones celulares diferenciadas que dan lugar a los monocitos, basándose en la expresión de múltiples proteínas de la superficie celular. Los modelos actuales proponen que, tanto los monocitos de sangre, muchos subconjuntos de macrófagos y la mayoría de las DC se originan *in vivo* a partir de: células madre hematopoyéticas (HSC), las cuales dan lugar a células mieloides con potencial de diferenciación restringido (MP) (Figura 5). Las etapas comprenden la diferenciación de la MP a un precursor común de monocitos, macrófago y DC, el MDP (Van Hemer S, 2009).

Los MDP son un subconjunto de células proliferantes en la médula ósea que comparten características fenotípicas con poblaciones precursoras mieloides, pero en gran medida no pueden diferenciarse en granulocitos (otro tipo de células del linaje mieloides). Dentro de la médula ósea, los MDP se pueden diferenciar a monocitos, o en el precursor común de DC (CDP) (Hume, 2008).

Cuando el ambiente celular promueve la formación de monocitos, la MDP se diferencia en monoblasto y este posteriormente en promonocito. En humanos el promonocito puede dar lugar a dos subpoblaciones de monocitos, las cuales se definieron inicialmente con la expresión de las moléculas de superficie CD14 y CD16. Hay dos tipos principales de monocitos, unos con alta expresión de CD14 y carentes de CD16 ( $\text{CD14}^+ \text{CD16}^-$ ) y otros con baja expresión de CD14 y que expresan CD16

(CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>). En ratones también el promonocito puede generar dos subgrupos de monocitos, Ly-6C<sup>+</sup> y Ly-6C<sup>-</sup>, estos saldrán de la médula ósea hacia la sangre. Los monocitos Ly-6C<sup>-</sup> generan los macrófagos residentes tisulares que se encuentran en el bazo, hígado, pulmón e intestino, y realizan un papel como centinelas en dichos tejidos. Mientras que los monocitos Ly-6C<sup>+</sup> se diferencian en macrófagos inflamatorios en respuesta a infecciones o procesos inflamatorios (Geissmann 2010b y Wittamer, 2011).

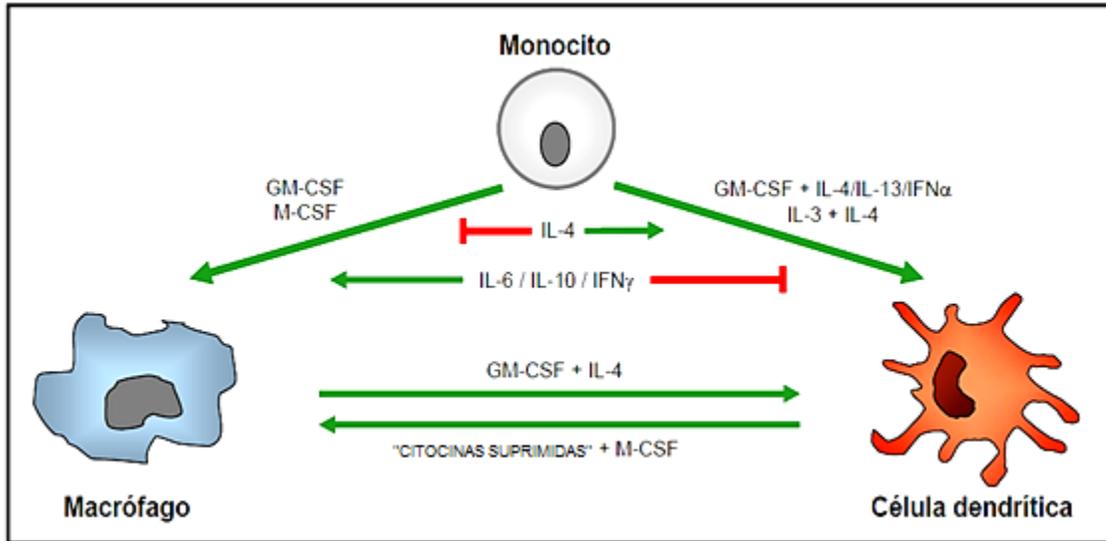


**Figura 5. Diferenciación de monocitos, macrófagos y células dendríticas.** La MDP da lugar a monocitos y CDP. Los dos monocitos Ly-6C<sup>+</sup> y Ly-6C<sup>-</sup> abandonan la médula ósea y salen a torrente sanguíneo. Los CDP dan lugar a pre-cDC y a PDC. Las pre-cDC circulan en sangre y entran a tejidos linfoides, donde darán lugar a DC CD8α<sup>+</sup> y CD8α<sup>-</sup>, y en tejidos no linfoides se generan DC CD103<sup>+</sup> de lámina propia. Bajo condiciones homeostáticas, los monocitos Ly-6C<sup>-</sup> pueden contribuir con los macrófagos y monocitos Ly-6C<sup>+</sup> para convertirse en DC CD103<sup>+</sup> en tejidos no linfoides. Durante la inflamación los Ly-6C<sup>+</sup> dan lugar a TiPDC, macrófagos inflamatorios y tal vez contribuyen con la generación de MDSCs asociadas con tumores. La HSC también puede dejar la médula y dirigirse a tejidos periféricos y diferenciarse en células mieloides durante la inflamación. **HSC:** célula madre hematopoyética; **CDP:** progenitor común de DC; **MDP:** precursor común de monocitos, macrófago y DC; **MP:** células mieloides con potencial de diferenciación restringido; **pre-cDC:** células dendríticas preclásicas; **PDC:** células dendríticas plasmocitoides, **MDSCs:** células supresoras de origen mieloide (Geissmann, 2010a).

Los procesos de diferenciación mieloide poseen gran plasticidad; así, se ha observado que en situaciones de infección e inflamación, la migración de los monocitos a los sitios de inflamación y posteriormente su diferenciación a DC. Los monocitos Ly-6C<sup>+</sup> pueden ser movilizados de la médula ósea hacia los tejidos inflamados por un mecanismo dependiente de CCR2, y una vez allí, pueden diferenciarse a DC productoras de TNF- $\alpha$  (TipDC) o macrófagos M1 (Kaushansky, 2010).

A lo largo de toda la ruta de diferenciación, las células de linaje mieloide son reguladas por un amplio número de citocinas, entre las que se encuentran: GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-4, e IL-6. Cabe mencionar que además de las citocinas estimuladoras de la mielopoyesis existen también un número considerable de citocinas que la inhiben, como sucede con el TNF- $\alpha$ , el TGF- $\beta$ , la proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) e interferones, entre otras. Estas moléculas son capaces de disminuir los niveles de células madre y células progenitoras hematopoyéticas mediante la inhibición de su proliferación; dicha inhibición puede ocurrir de manera directa, disminuyendo la expresión de receptores de moléculas estimuladoras o a través del efecto sinérgico entre dos o más factores, causando una supresión en la proliferación y formación de colonias hematopoyéticas (Chang, 2009).

De forma general, las citocinas son el estímulo crítico para que los monocitos avancen hacia cada una de sus alternativas de diferenciación. De hecho, la primera citocina con la que los monocitos entran en contacto determina el programa de diferenciación y su perfil de respuesta a otras citocinas. La diferenciación *in vitro* de monocitos a macrófagos o DC es un ejemplo de dicha dependencia (Figura 6). Las citocinas comúnmente empleadas para generar DC derivadas de monocitos (MDDC) *in vitro* son GM-CSF e IL-4, mientras que los macrófagos se diferencian en presencia de GM-CSF o M-CSF. En humanos, la IL-4 favorece la diferenciación de monocitos a DC e impide la generación de macrófagos, mientras que la presencia de IL-6 limita la generación de estas células y promueve la diferenciación a macrófagos de manera dependiente de M-CSF. Por otra parte, el entorno celular y la presencia de estímulos externos también condicionan la diferenciación del monocito inducida por citocinas (Chang, 2009).



**Figura 6. Diferenciación *in vitro* de monocitos.** Esquema ilustrativo de la plasticidad y la estímulo-dependencia de la diferenciación de monocitos de sangre periférica (Sierra, 2010).

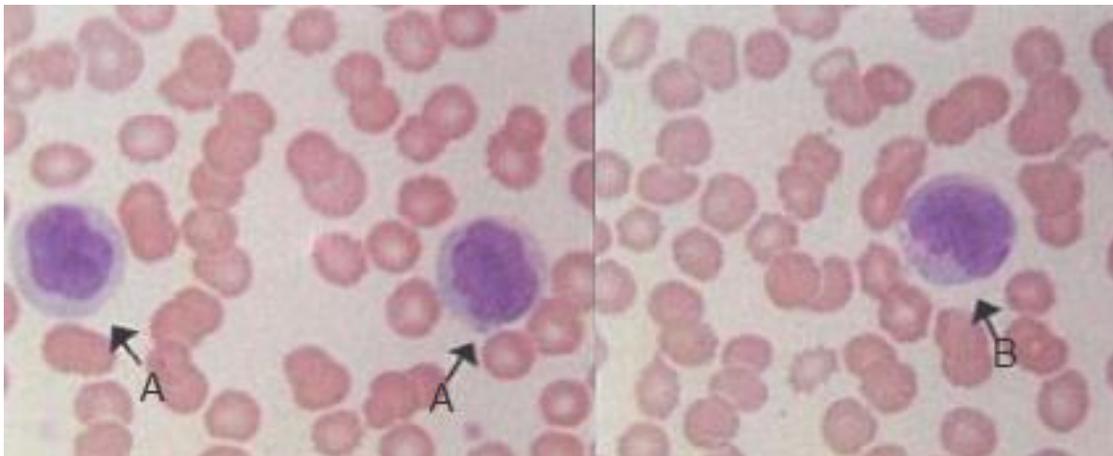
En general, las células del SFM proceden de un progenitor común, incluso dependiendo de las condiciones homeostáticas, los monocitos pueden diferenciarse tanto en macrófagos como en DC en los distintos compartimientos del organismo, y dicha localización anatómica definirá las características fenotípicas y funcionales de estas células, razón por la cual la heterogeneidad y plasticidad del SFM resulta bastante compleja (Villalta y Chang, 2009).

### 3.2. Morfología de monocitos y sus precursores.

Los monoblastos y promonocitos son los precursores directos una vez que la MDP se diferencia hacia el linaje de los monocitos. Estas células se caracterizan por tener cromatina nuclear dispersa finamente y nucléolos que se pueden apreciar en frotis de sangre o médula ósea mediante tinción Wright (Bennink, 2009).

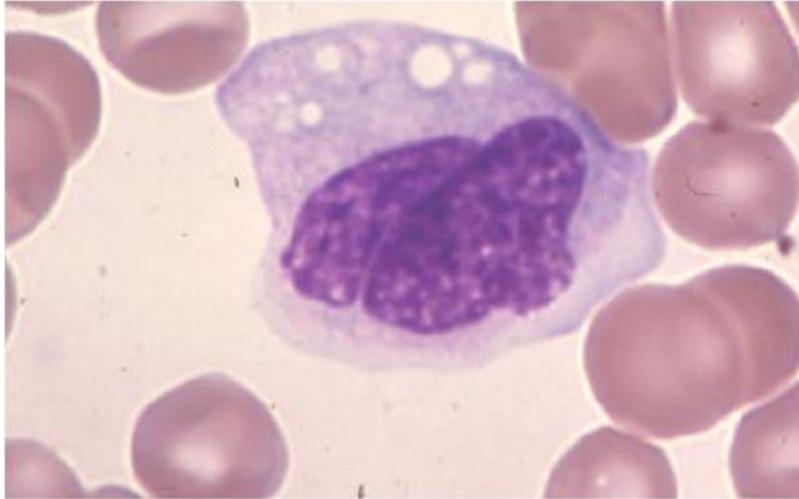
El monoblasto tiene un periodo de vida muy bajo en médula ósea, es una célula redonda con un gran núcleo redondo, provisto de cromatina muy laxa con numerosos nucléolos, su tamaño es superior al de los mieloblastos (15-25  $\mu\text{m}$ ). Su citoplasma, más abundante que el del mieloblasto es intensamente basófilo (azulado con Tinción de Wright), un dato muy importante en el monoblasto es la existencia de una elevada

positividad esterasa inespecífica fluorosensible (Van Hemer, 2009). Los promonocitos son claramente identificables en médula ósea, pese a su escaso número, miden 12 a 18  $\mu\text{m}$  y tienen una elevada relación núcleo-citoplasma. El núcleo es de aspecto irregular, con pliegues y muescas, posee una cromatina relativamente condensada, a pesar de lo cual son visibles los nucléolos. El citoplasma es altamente basófilo por su gran riqueza de poli-ribosomas y puede contener granulaciones azurófilas, lo que en ocasiones hace difícil distinguirlos de los promielocitos (Figura 7a y 7b). Citoquímicamente contienen fosfatasa ácida, naftol-As-D-acetoesterasa fluorosensible, peroxidasa y arilsulfatasa (Mayani, 2007).

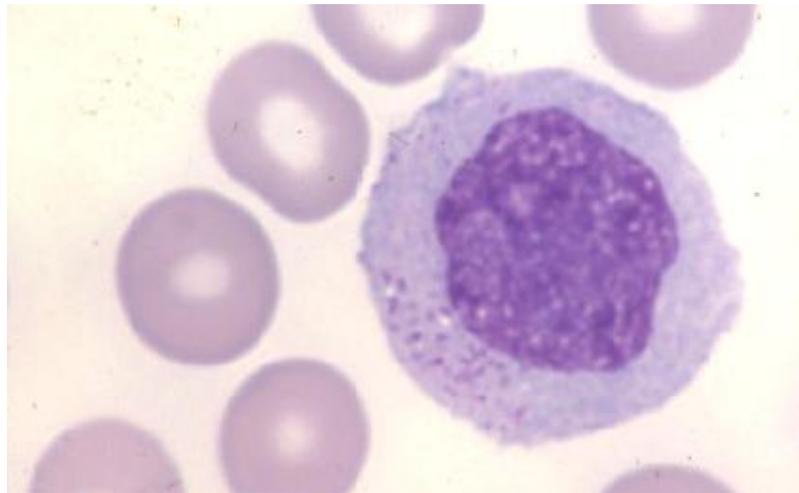


**Figura 7. Tinción de Wright de muestra de Médula ósea. A) Monoblasto y B) Promonocito (Kaushansky, 2010).**

Los monocitos tienen un diámetro de 12 a 15  $\mu\text{m}$  (Figura 8) y sus características morfológicas son variables, dependientes de la actividad que ejercerán. El núcleo de los monocitos ocupa aproximadamente la mitad de la superficie de la célula y por lo general es excéntrico, es de forma arriñonada, pero puede llegar a ser redondo o irregular, el cual contiene una red de cromatina característica con filamentos formando pequeños puentes de grupos de cromatina. Los agregados de cromatina se organizan a lo largo de la cara interna de la membrana nuclear. Mediante la tinción de Wright, el citoplasma presenta manchas de color gris azulado y numerosos gránulos de color rosa-púrpura, que a veces, son lo suficientemente numerosos para dar una apariencia completamente rosada al citoplasma, además de esto, se llega a apreciar a las vacuolas citoplasmáticas (Figura 9) (Bennink, 2009).



**Figura 8. Monocito en sangre periférica teñido con Wright.** Núcleo reniforme con una relación núcleo-citoplasma elevada. Se observa la cromatina condensada formando agrupaciones además de estar presentes vacuolas citoplasmáticas (Bennink, 2009).



**Figura 9. Monocito con núcleo de forma circular.** Las granulaciones azurófilas son evidentes en el citoplasma de la célula (Kaushansky, 2010).

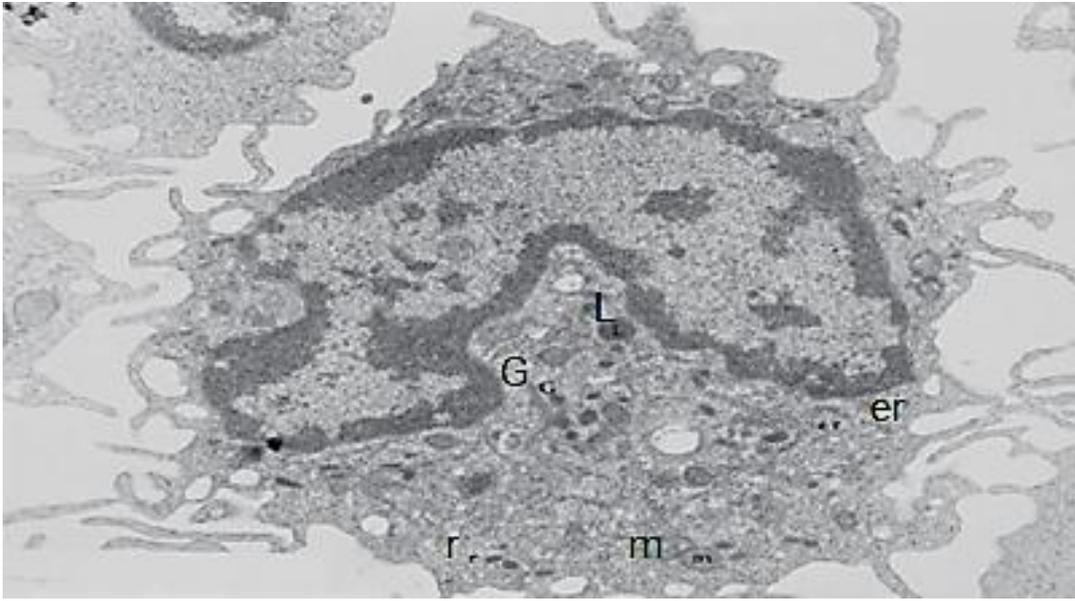
Cuando se examina a través de un Microscopio de contraste de fases, el núcleo de los monocitos tiene un patrón de cromatina claro sobre un fondo nublado, este núcleo presenta una depresión yuxtannuclear ocupada por un centrosoma con movimiento activo ondulante similar al de otros leucocitos. El citoplasma es de color gris claro, las mitocondrias son muy finas y en ocasiones forman una roseta pequeña yuxtannuclear alrededor del centrosoma (Kelley, 2007).

La locomoción de los monocitos tiene el mismo patrón de pseudópodos citoplasmáticos ondulantes que los macrófagos. En general los monocitos adoptan una forma triangular al momento de desplazarse de un punto a otro. La forma de propagación de los monocitos revela que el núcleo y los gránulos se encuentran en el centro y el hialoplasma es abundante en la periferia de la célula, terminando en bordes, lo cual demuestra el movimiento ondulante de esta célula (Kelley, 2007).

Cuando se observa al microscopio de contraste de fases, los monocitos pequeños, pueden confundirse con los linfocitos grandes; sin embargo una característica notable de los monocitos es la membrana plasmática ondulante, que forma prominentes pliegues densos en la superficie y bordes celulares. La ondulación de la membrana plasmática y la presencia de vesículas en la superficie de los monocitos, tiene un significado funcional (Yang, 2011).

Tanto para la fagocitosis y movilidad del monocito, estas funciones requieren de contacto físico con partículas o superficies celulares. De forma que la reducción en el radio de curvatura de la superficie celular por la formación de ondulaciones (pseudópodos) o microvellosidades pueden ser por la reducción de las fuerzas de repulsión cuando grupos de carga negativa en la superficie celular se aproximan y se ponen en contacto con sustratos con carga negativa o con otra célula. Además, esta reducción de la membrana puede proveer de reservas a la membrana para la fagocitosis y locomoción (Yang, 2011).

Visto al microscopio de transmisión electrónica, el núcleo de los monocitos contiene uno o dos nucléolos rodeados por cromatina, el citoplasma contiene pequeñas cantidades de retículo endoplásmico y una cantidad variable de ribosomas, Las mitocondrias son numerosas, pequeñas y alargadas, el Aparato de Golgi está bien desarrollado y está situado cerca del centrosoma dentro de la hendidura nuclear, los microtúbulos son numerosos y las microfibrillas se encuentran agrupadas alrededor del núcleo (Figura 10) (Webster, 2010).



**Figura 10. Microscopia de transmisión electrónica de barrido de un monocito.** El núcleo excéntrico de forma reiforme con un patrón característico de cromatina dispersa. El aparato de Golgi (**G**) se encuentra en una posición yuxtannuclear. Pequeñas cantidades de retículo endoplásmico (**er**) y poli-ribosomas (**r**) están presentes, sobre todo alrededor de la periferia celular. Las mitocondrias (**m**) se encuentran en la región de aparato de Golgi, además se encuentran dispersas sobre la periferia celular. Los lisosomas (**L**) se observan como pequeños gránulos densamente electronegativos, delimitados por una membrana (Kaushansky, 2010).

En los cultivos celulares de macrófagos, los microfilamentos se encuentran debajo de la membrana plasmática, cerca de los sitios en los cuales la célula se une a sustratos o a partículas fagocitables. Como ya se ha mencionado, la superficie celular se caracteriza por sus numerosas microvellosidades y vesículas para micropinocitosis. Los gránulos citoplasmáticos se asemejan a los encontrados en los granulocitos, miden aproximadamente 0.05 a 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, son densos y homogéneos, se encuentran delimitados por una membrana y están empaquetados por el Aparato de Golgi, así como los gránulos lisosomales de otros leucocitos (Mayani, 2007).

El contenido enzimático es producido por el complejo ribosomal de la célula, estos gránulos contienen fosfatasa ácida y arilsulfatasa, por lo tanto son los principales lisosomas. Después de la endocitosis, estos lisosomas se funcionan con el fagolisosoma, formándose así lisosomas secundarios (Webster, 2010).

### **3.3. Histoquímica de monocitos.**

Los monocitos contienen una importante cantidad de enzimas proteolíticas e hidrolíticas, las cuales pueden ser identificadas mediante tinciones histoquímicas. El fin de producir estas enzimas es para su liberación a partir de gránulos primarios y secundarios dentro del fagosoma, bajo estímulos de complejos, por ejemplo: los de antígeno-anticuerpo. Al mismo tiempo se pueden sintetizar compuestos microbicidas dependientes de oxígeno o radicales libres, los cuales actúan sobre diferentes patógenos: bacterias, virus, hongos (Kelley, 2007).

Los leucocitos contienen estererasas, un grupo de enzimas lisosómicas que hidrolizan los ésteres alifáticos y los aromáticos. Las estererasas se asocian a los gránulos azurófilos (inespecíficos). Se han distinguido distintas isoenzimas de estererasas con una variable distribución celular y diferente especificidad de sustrato; las isoenzimas 2, 7 y 9 en los neutrófilos, la isoenzima 6 en las células plasmáticas y las isoenzimas 4 y 5 en los monocitos. Las estererasas de monocitos son inhibidas por fluoruro de sodio, mientras que las estererasas de la serie granulocítica no lo son. La reacción esterasa no específica es positiva en promielocitos y mielocitos, por lo tanto, en el análisis de la inhibición de fluoruro es necesario distinguir monocitos de médula ósea de mielocitos tempranos (Kaushansky, 2010).

Los gránulos de los monocitos, aunque heterogéneos en tamaño, no son separables en poblaciones por criterios habituales de microscopía electrónica. Los promonocitos humanos de médula y los monocitos de sangre contienen gránulos que comprenden dos poblaciones funcionalmente distintas. Una población contiene fosfatasa-ácida, arilsulfatasa y peroxidasa (Ruiz, 2004). Estos gránulos son modificados por los lisosomas primarios y son análogos a los gránulos azurófilos de los neutrófilos. La población de gránulos en monocitos es heterogénea en la reactividad citoquímica de la peroxidasa, la fosfatasa ácida, y arilsulfatasa. Además, los gránulos primarios que son morfológicamente idénticos con otras vesículas pueden ser identificados citoquímicamente como lisosomas. El contenido de la otra población de gránulos en los

monocitos se encargan del reciclaje de hierro proveniente de eritrocitos mediante la formación de siderosomas (cúmulos de ferritina/hierro) (Goasgen, 2009).

En la tabla 3 se compara el contenido de enzimas hidrolíticas de los monocitos, neutrófilo y linfocitos:

**Tabla 3. Reacciones Citoquímicas de enzimas leucocitarias.** Muchas lisozimas producidas por fagocitos mononucleares son secretadas en lugar de almacenarse intracelularmente (+: moderadas, ++: abundantes) (adaptado de Kaushansky, 2010).

Reacciones Citoquímicas de enzimas leucocitarias			
Enzimas	Monocitos	Neutrófilos	Linfocitos
Fosfatasa ácida	++	+	+
$\beta$ -Glucurodinasa	++	-	- a +
Sulfatasa	+	+	-
N-Acetilglucosaminidasa	++	++	-
Lisozima	++	++	-
Peroxidasa	+	++	-
Fosfatasa alcalina	-	- a +	-
Naftol AS-D Cloroacetato esterasa	- a +	++	-

### 3.4. Receptores de superficie de Monocitos y Macrófagos.

Los fagocitos mononucleares tienen receptores en su superficie que pueden ser caracterizados por su unión específica a anticuerpos monoclonales específicos. Estos receptores (Tabla 4) son marcadores importantes para el origen, crecimiento, diferenciación, activación, reconocimiento, migración y para la función tanto del monocito como para el macrófago (Sierra, 2010).

#### 3.4.1. Receptores para péptidos y moléculas pequeñas (receptores FcYR).

Los FcYR se expresan en la superficie de las células mononucleares, granulocitos y plaquetas. Los FcYR se unen específicamente a las subclases de IgG humanas: IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>. Estos FcYR se dividen en tres distintas clases: FcYRI, FcYRII y FcYRIII. Tienen un amplio alcance de expresión en distintas células. El primer receptor de IgG, el **FcYRI** (CD64), es un receptor que se encuentra en los monocitos, macrófagos y neutrófilos activados. Este receptor se une a la IgG monomérica a través de la porción Fc de la molécula, este receptor de inmunoglobulina tiene una mayor expresión en monocitos,

macrófagos activados y DC. El CD64 permite mediar la endocitosis a partir del complejo antígeno-IgG para la presentación a los LT, además puede desencadenar la liberación de citocinas e intermediarios reactivos de oxígeno (Van Hemer, 2009).

**Tabla 4. Receptores de superficie de fagocitos mononucleares** (adaptado de Kaushansky, 2010).

<b>Receptores de superficie de Monocitos-Macrófagos</b>	
<b>Receptores Fc</b>	IgG2a, IgG2b/IgG1, IgG3, IgA, IgE
<b>Receptores de complemento</b>	C3b, C3bi, C5a, C1q
<b>Receptores LPS</b>	CD14
<b>Receptores de citocinas</b>	MIF, MAF, LIF, CF, MFF, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-18, INF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$ , GM-CSF, MCSF/CSF-1
<b>Receptores de quimiocinas</b>	CCR1, CCR2A, CCR2B, CCR3, CXCR4, CCR5
<b>Receptores para factores de crecimiento de macrófagos</b>	M-CSF, GM-CSF
<b>Receptores Toll-like</b>	TLR2, TLR4, TLR5, TLR9
<b>Receptores para agentes coagulantes y anticoagulantes</b>	Fibrinógeno/fibrina, factor de coagulación VII, $\alpha$ 1-antitrombina, heparina e integrinas (CD11b,CD18)
<b>Receptores de hormonas</b>	Insulina, glucocorticoides, angiotensina
<b>Receptores de lipoproteínas</b>	Lipoproteínas de baja densidad aniónicas, PGE2, LTB4, LTC4, PAG

El segundo receptor de IgG, **FcYRII** (CD32), es un receptor de amplia distribución, está presente en muchos tipos de células, como monocitos, plaquetas, neutrófilos, LB, algunos LT, y algunas de endotelio capilar. Este receptor se puede unir al complejo IgG en lugar de la IgG monomérica. Este FcYR también puede inducir la liberación de mediadores de células mieloides y la fagocitosis de partículas recubiertas de Ig in vitro.

El tercer receptor de IgG, **FcYRIII** (CD16), se expresa en neutrófilos, células NK y macrófagos tisulares. Este receptor se puede unir a los complejos inmunes de Ig y en aquellas que se encuentran en la superficie de las membranas celulares. Este FcYR es el principal responsable de la respuesta celular citotóxica dependiente de anticuerpos. La interacción de FcYR en los macrófagos con complejos inmunes da como resultado la "activación" de la célula y un aumento de la fagocitosis, así como en la producción de

superóxido y de prostaglandinas, además de la liberación de leucotrienos (Kaushansky, 2010 y Ruiz, 2004).

#### 3.4.2. Receptores para complemento.

Se han identificado receptores que se unen a fragmentos del componente C3 del complemento. El receptor de complemento CR1 (o CD35) se une a C3bi dimérica y se encuentra en monocitos y macrófagos. Su activación contribuye a la ingestión de células blancas. El receptor de complemento CR3 (CD11b) se une al fragmento C3b. CR3 es una glicoproteína heterodimérica que se compone de dos polipéptidos unidos no covalentemente. Este receptor y los antígenos leucocitarios funcionan asociados al antígeno (CD11a) y a la cadena de la integrina alfa-X (CD11c) formando una familia de heterodímeros que comparten una subunidad común (CD18). Esta familia se designa como subfamilia de integrinas (B2) leucocitarias. Estos heterodímeros están implicados en las interacciones célula-célula, incluyendo el tráfico de leucocitos en los tejidos, la unión de partículas opsonizadas y proteínas del plasma, y la unión a diversos sustratos. También pueden modular la adhesión intercelular (Ezparza, 2007).

#### 3.4.3. Receptores tipo Toll.

En mamíferos se han descrito hasta el momento diez proteínas TLR (Tabla 5) de las cuales los TLR 2, 4, 5 y 9 se encuentran presentes en fagocitos mononucleares, todas con un dominio intracitoplásmico y una región homóloga al receptor para IL-1, y por lo tanto, son capaces de transducir señales (Figura 11) (Espinoza, 2005).

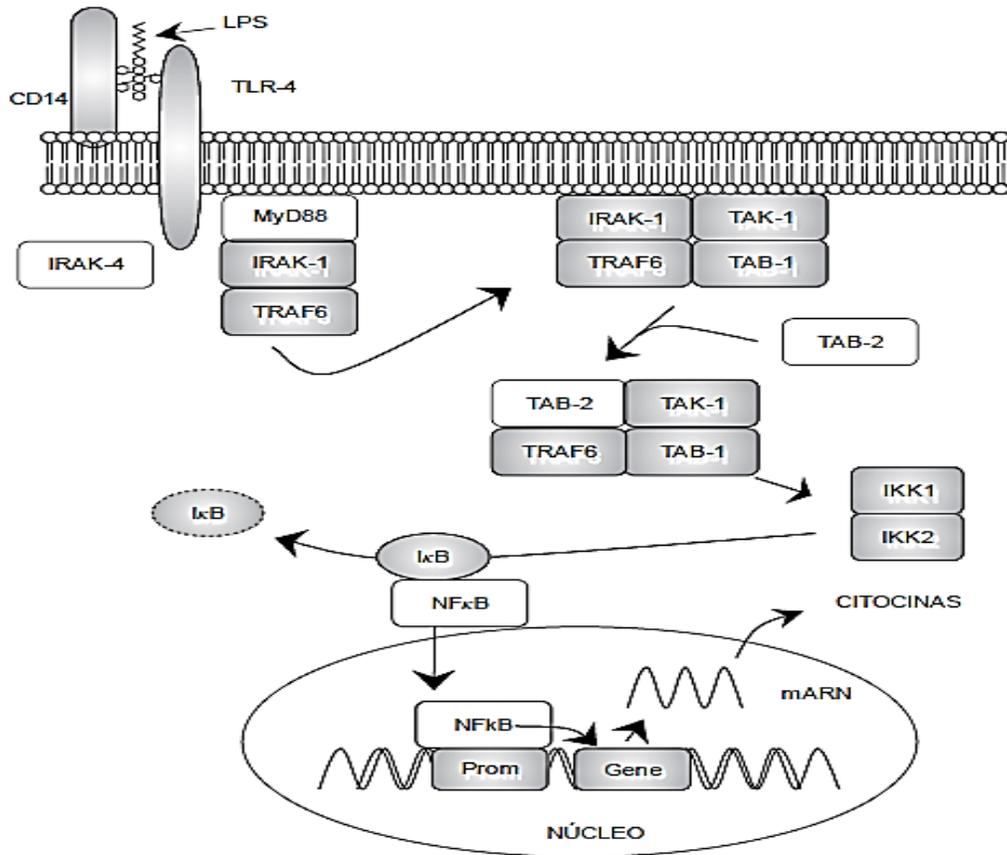
Aunque hay vías particulares de señalización y activación celular según el TLR involucrado, una secuencia representativa de eventos podría ser la siguiente: la interacción del TLR con su ligando promueve el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88 con el receptor. El complejo formado, recluta a su vez a alguna(s) de las cinasas asociadas al receptor para IL-1 (IRAK1/IRAK4). Durante la formación de este complejo, IRAK4 se activa ocasionando la hiperfosforilación de IRAK1, lo cual promueve la asociación de TRAF6 con el complejo. La asociación entre IRAK4/IRAK1/TRAF6 causa cambios conformacionales en uno o más de estos factores,

ocasionando su separación del complejo IRAK1/TRAF6 del receptor y su translocación a la membrana donde interacciona con otro complejo preformado compuesto por TAK1, TAB1 y TAB2. Esta interacción induce la fosforilación de TAB2 y TAK1, los cuales entonces se translocan al citosol junto con TRAF6 y TAB1. TAK1 es subsecuentemente activado en el citoplasma para activar a su vez al inhibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (Phillip, 2007).

**Tabla 5. Receptores TLR en mamíferos y sus ligandos.** No se han identificado con certeza los ligandos naturales para TLR7, TLR8 y TLR10 (adaptado de Espinoza, 2005).

RECEPTOR	LIGANDO
TLR1	Triacil-lipopéptidos (bacterias, micobacterias) Factores solubles ( <i>Neisseria meningitides</i> )
TLR2	Peptidoglicanas y lipoproteínas Glicoinositolfosfolípidos ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ) Glicolípidos ( <i>Treponema</i> ) Porinas ( <i>Neisseria</i> ) Zimozan (Zimosan)
TLR3	ARN doble cadena (virus)
TLR4	Lipopolisacáridos (G-negativos) Ácido lipoteicoico (G-positivos) Lipoarabinobanas (micobacterias) HSP60 y HSP70 (huésped)
TLR5	Flagelina (bacterias)
TLR6	Lipoproteínas (diacil-lipopéptidos de micoplasma)
TLR9	CpG ADN

El I $\kappa$ B inactivo secuestra al NF- $\kappa$ B en el citoplasma pero su activación induce su fosforilación y degradación con la consecuente liberación de NF- $\kappa$ B. El NF- $\kappa$ B liberado pasa al núcleo donde se asocia a promotores de genes codificantes de citocinas promoviendo así la estimulación celular para generar una respuesta contra un patógeno (Figura 11) (Phillip, 2007).



**Figura 11. Vía de señalización del TLR en fagocitos mononucleares.** Fosforilación de IκB ocasionando su rápida degradación y la liberación de NF-κB, el cual entonces pasa al núcleo donde se enlaza a secuencias promotoras específicas de genes inmunomoduladores, promoviendo la síntesis de citocinas y de moléculas coestimuladoras que regulan la actividad de los LT y LB, mediadores de la inmunidad específica (Espinoza, 2005).

La importancia de los TLR en la inmunidad innata se deduce de situaciones como la observada en los ratones C3H/HeJ, donde una mutación homocigótica en el TLR4 está relacionada con defectos de señalización y con su alta susceptibilidad a infecciones por microorganismos Gram-negativos (Hartman, 2011).

#### 3.4.4. CD14, CD16 Y CD68.

La molécula CD14 es uno de los antígenos de superficie más característicos en los monocitos, su expresión es elevada en la superficie, pero es débil en la de los granulocitos y en la mayoría de los macrófagos que se encuentran en tejidos. El CD14 funciona como un receptor para endotoxinas (LPS). Los LPS se unen a una proteína del suero, lo que facilita la unión del LPS a CD14. El correceptor MD2 y TLR4 también son vitales en este proceso. Cuando los LPS se unen a CD14/MD-2/TLR4, expresados por

monocitos o neutrófilos, las células se activan y liberan citocinas como el TNF y regula la elevación de moléculas de superficie celular, tales como las moléculas de adhesión. En sistemas *in vitro*, el CD14 soluble se une a LPS, y el complejo formado estimula a células que no expresan CD14 a secretar citocinas y coregular moléculas de adhesión (Yu, 2007 y Kaushansky, 2010).

Un subconjunto de monocitos en sangre humana expresan bajos niveles de CD14 y altos niveles de Fc $\gamma$ RIII (CD16) ha sido identificado. Estos monocitos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> representan entre el 5 y 10 % de los monocitos en sangre periférica de individuos normales y pueden elevarse considerablemente en condiciones patológicas, como: sepsis, VIH y cáncer. Los monocitos CD16<sup>+</sup> que producen altos niveles de citocinas pro-inflamatorias que, *in vivo*, pueden ser precursores de DC, ya que tienden a diferenciarse a este tipo de células. Los mecanismos de reclutamiento de monocitos CD16<sup>+</sup> dentro de los tejidos siguen siendo desconocidos. El antígeno CD68 es un marcador “específico” de monocitos y macrófagos. Los anticuerpos contra este antígeno, señalan a macrófagos y a otros miembros de los fagocitos mononucleares en secciones de tejidos procesadas rutinariamente y su expresión en estas células parece estar relacionada con la captación de lipoproteínas de baja densidad así como en procesos de fagocitosis (Kunisch, 2006).

#### 3.4.5. CD11c/CD18.

Esta familia de integrinas, de adhesión, está constituida por tres heterodímeros, que comparte una subunidad  $\beta$ , denominada CD18, con una subunidad  $\alpha$  diferente: CD11a (LFA-1), CD11b (MAC-1) y CD11d ( $\alpha$ D). Este grupo de integrinas participa en la migración, supervivencia y en la proliferación celular. La subunidad CD11a es expresada en todos los leucocitos; CD11b y CD11d se expresan predominantemente en monocitos y macrófagos, en menor proporción en LB, pero más en leucocitos polimorfonucleares. CD11b se expresa en más del 95 % de los monocitos y macrófagos inmaduros, pero disminuye rápidamente en células que se mantienen *in vitro*. Los anticuerpos específicos para CD11b, como OKM1 o Mo1, pueden bloquear la capacidad de este receptor de complemento, ya que es capaz de unirse a CD3bi, de

hecho, una de las propiedades primeramente descritas fue la habilidad de CD11c para mediar la fagocitosis de partículas opsonizadas por C3bi, como consecuencia, se le conoce como el receptor 4 de complemento. Para el caso del CD18, participa en conjunto CD11c en procesos de adhesión celular y en la respuesta inmune (Sadhu, 2007).

#### 3.4.6. CD4.

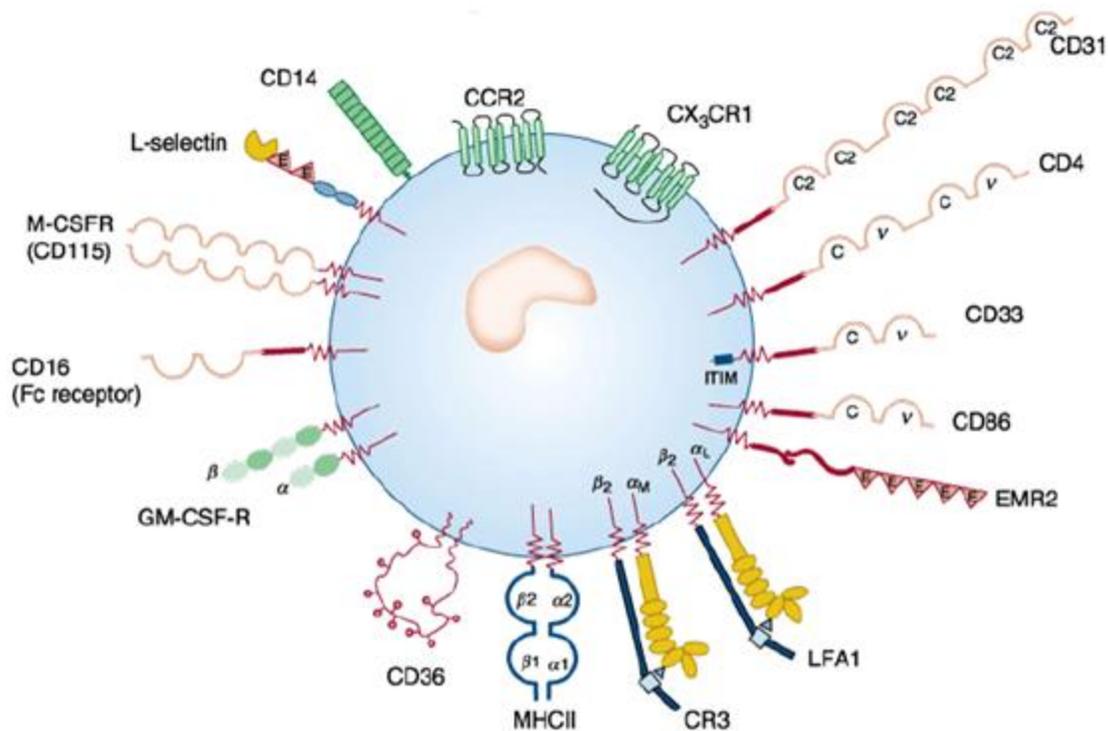
El antígeno de superficie CD4 se expresa exclusivamente en LT cooperadores. El CD4 y su RNAm correspondiente se han encontrado en monocitos, macrófagos, y la línea celular de monocitos U-937. La molécula CD4 está involucrada en la inducción de la proliferación y funciones de los TH, en respuesta a una estimulación antigénica, sin embargo, su papel específico en la función de los monocitos/macrófagos aún no se ha determinado. Un aspecto importante del fenotipo de los monocitos/macrófagos es la presencia de moléculas CD4 en su superficie que pueden actuar como receptores para el HIV tipo 1 (HIV-1). El HIV-1 utiliza los receptores CD4 como vía de entrada para la infección de células (Suzu, 2005).

#### 3.4.7. Receptores de quimiocinas.

Las quimiocinas ejercen su actividad uniéndose a receptores específicos de la célula blanco, estos pertenecen a una amplia familia de receptores acoplados a proteína-G, con siete dominios transmembranales. En humanos, los fagocitos mononucleares expresan varios receptores para quimiocinas. Los monocitos responden a señales de activación mediadas por quimiocinas, permitiendo así, poner en marcha numerosos eventos, como la adhesión y migración, los cuales están asociados con la diapédesis (Chihara, 2010).

Uno de los receptores para quimiocinas predominantes en monocitos/macrófagos es el CCR2. El CCR2 es un receptor de quimiocinas inflamatorias, lo cual media la migración de linfocitos, neutrófilos, células dendríticas y monocitos/macrófagos a sitios inflamados. Varias quimiocinas se pueden unir al CCR2 humano y estimulan la migración celular, tales como: CCL2, CCL7 y CCL13. La figura 12 muestra algunos de

los receptores implicados en la activación de los monocitos. Estos incluyen a receptores de quimiocinas, moléculas de adhesión y de inmunoregulación, así como receptores involucrados en el reconocimiento de microorganismos, en la inmunidad innata, fagocitosis y en mecanismos de muerte celular (Volpe, 2012).



**Figura 12. Representación esquemática de moléculas estructurales de monocitos, de receptores y antígenos de superficie** (Kaushansky, 2010).

La identificación de los receptores de superficie en los fagocitos mononucleares ha sido de gran ayuda, ya que ha colaborado con el establecimiento del grupo celular que conforma al SFM, así como su papel en patologías como el cáncer, infecciones virales y bacterianas, entre otras (Wittamer, 2011). Por ejemplo, se sabe que *M. tuberculosis* ingresa a los fagocitos mononucleares a través de una endocitosis mediada por receptores: de manosa, de complemento (CR1, CR2, CR3 y CR4), de la proteína surfactante y SR, entre otros. Por lo tanto, conocer los receptores que comparten las células del SFM pueden conducir a la generación de nuevos agentes terapéuticos y profilácticos contra diversas enfermedades (Roja, 2010).

### **3.5. Interacción de los Monocitos/Macrófagos con plaquetas y en la cascada de coagulación.**

La participación de los fagocitos mononucleares en la cascada de coagulación es sumamente importante, aunque este tema aún no ha recibido la atención que merece. Se ha observado que los monocitos circulantes pueden llegar a interactuar con las plaquetas y células endoteliales, iniciando una serie de uniones que producirán una interacción estable entre los leucocitos y plaquetas formando un coágulo, y al mismo tiempo se induce a los monocitos para expresar factor tisular (TF), contribuyendo así en la trombogénesis y el primer nivel de curación de la herida (Shechter, 2009).

También los monocitos y macrófagos que se encuentran en los sinusoides hepáticos (células de Kupffer) y en el bazo, fácilmente reconocen a plaquetas activadas, uniéndose a ellas para removerlas y destruirlas. Además, los monocitos participan en la producción de potentes procoagulantes, expresando TF sobre su superficie, iniciando de esta forma la cascada de coagulación que, si es mal regulada, puede conducir a coagulación intravascular difusa durante el shock séptico. Se sabe que el TF expresado por los monocitos, en presencia de fosfolípidos es capaz de incrementar la activación del factor VII de la vía extrínseca de la coagulación (Shechter, 2009).

El macrófago activado también expresa en su superficie TF y otras moléculas que participan en la hemostasis, tales como: protrombina, factores II, VII, IX y XIII y activadores e inhibidores del plasminógeno. Los macrófagos, son capaces de sintetizar y secretar productos derivados del ácido araquidónico, incluyendo prostaciclina y tromboxano, ayudando a modular la adhesividad de la plaqueta al endotelio y a fenómenos del tono vascular mediante el leucotrieno B<sub>4</sub>. Las citocinas como la IL-1 y el TNF- $\alpha$  pueden inducir la síntesis y expresión de TF por las células endoteliales y favorecer una regulación negativa de la actividad de la proteína C endotelial, actividades que promueven la trombogénesis (Shechter, 2009 y Kelley, 2007).

Después de una lesión o inflamación, los monocitos/macrófagos son capaces de producir urocinasa, para generar plasmina, que en conjunto con las células endoteliales

derivan al activador de plasminógeno tisular. La producción de urocinasa por macrófagos está regulada por estímulos fagocíticos principalmente, la activación enzimática puede enlazar al receptor activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPAR) en la superficie celular en un complejo que interacciona con proteasas-antiproteasas, dando lugar a la fibrinólisis, la cual es importante en la reparación del tejido (Rojas, 2009).

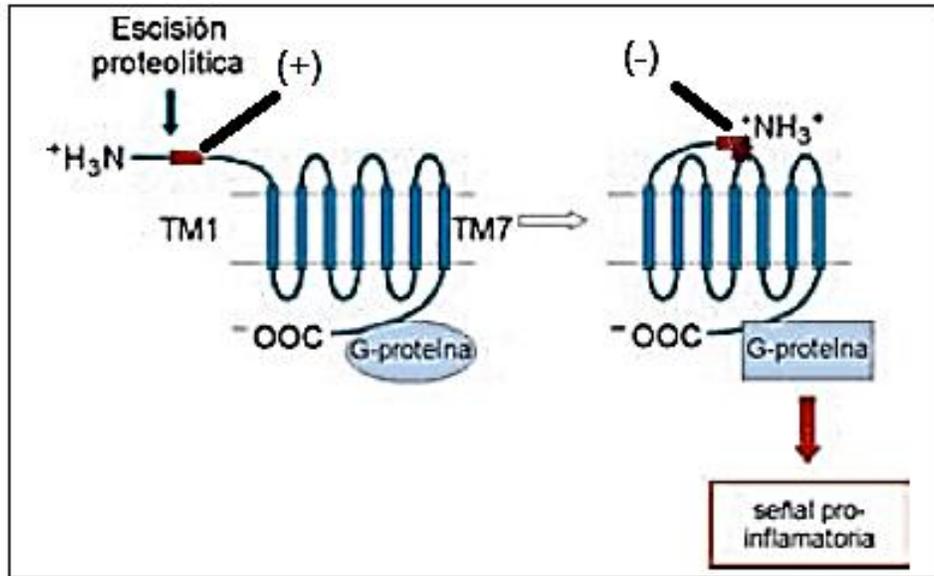
La naturaleza y origen del TF lipídico producido por los monocitos no está bien caracterizado. Estas células, al igual que los macrófagos, también producen una mezcla compleja de metabolitos lipídicos, que consisten en prostaglandinas lábiles, leucotrienos y tromboxanos, por la utilización de precursores derivados del ácido araquidónico y sustratos para enzimas como la fosfolipasa y la ciclooxigenasa, entre otros. El uso de la lipidómica para caracterizar dichos productos y estudiar su papel en el inicio y la resolución de la inflamación puede ser de utilidad para comprender el papel de los monocitos/macrófagos durante la hemostasia (Kaushansky, 2010 y Shechter, 2009).

### **3.6. Quimiotaxis y migración de monocitos**

Las situaciones de infección o trauma propician cambios en el microambiente tisular, dando origen a la formación de materiales tanto exógenos como endógenos con actividad quimiotáctica. La respuesta tisular a la agresión, o inflamación, de forma general, contempla cuatro acontecimientos interrelacionados entre sí: a) la estimulación de las terminaciones nerviosas libres provocando dolor y liberación de péptidos bioactivos (neuropéptidos), b) las células dañadas (piroptosis) liberan proteínas constitutivas intracelulares (HSP, factor nuclear HMGB1 y N-formil-péptidos mitocondriales); c) los microorganismos y sus diferentes productos incitan, en colaboración con los anteriores, una respuesta inmunológica innata, y d) señales emanadas del foco inflamatorio reclutando leucocitos en el lugar de la lesión (Espinoza, 2005).

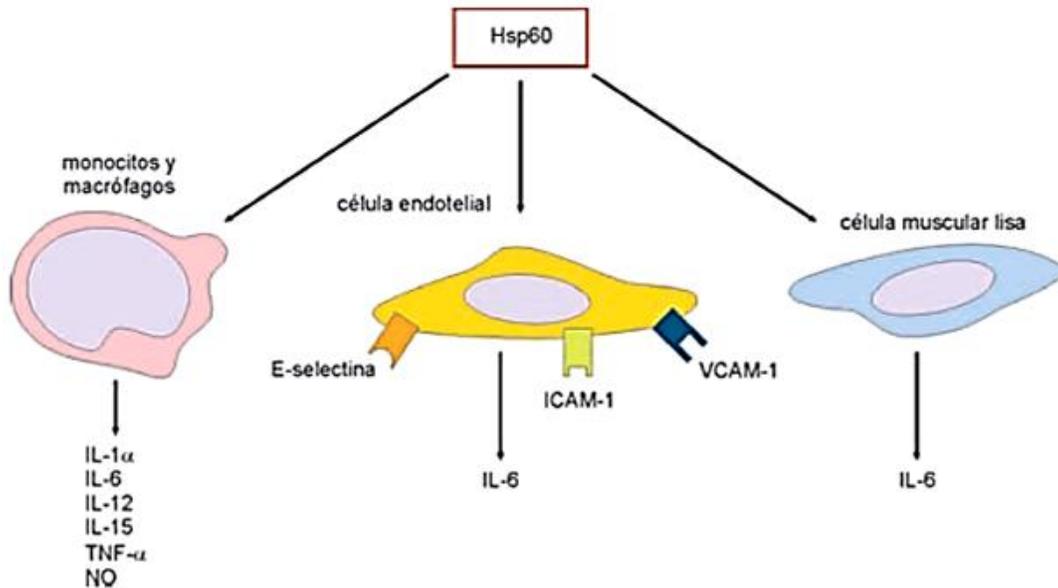
Una rápida respuesta para el reclutamiento de fagocitos mononucleares requiere de células centinelas residentes en los tejidos. Los macrófagos y especialmente las células cebadas, cumplen tal función. Después de una lesión, las terminaciones nerviosas libres sensitivas liberan neuropéptidos pertenecientes a la clase de taquininas (sustancia P y neurocininas), las cuales estimulan a las células cebadas, que en respuesta exponen sobre su membrana receptores específicos para mediadores pro-inflamatorios (Espinoza, 2005). Una vez iniciada la secuencia inflamatoria, estas células liberan histamina, triptasa, TNF- $\alpha$  preformado, eicosanoides, prostaglandinas inflamatorias, tromboxanos y leucotrienos, todos ellos en conjunto promueven los síntomas de inflamación y colaborarán con el reclutamiento celular en el sitio de afección. Por ejemplo: las triptasas mastocíticas cortan el extremo N-terminal extracelular de receptores activados por proteasas, develando secuencias previamente ocultas que autoactivan al receptor. Este pertenece a la clase de receptores acoplados a proteína G (GPCR) y está presente en células cebadas, endotelio vascular, plaquetas y neutrófilos (figura 13). Esto potencia la estimulación de los mastocitos y de las terminaciones nerviosas; haciendo al endotelio adherente para los monocitos, permeable al fluido intravascular y procoagulante (Laskin, 2009).

Los monocitos también son reclutados por señales quimioattractoras clásicas de los fagocitos mononucleares como: los péptidos formilados (PF) bacterianos, el factor 5a del complemento (C5a), la IL-8, el factor activador de plaquetas (PAF) y el leucotrieno B4 (LTB4). Los linfocitos también producen algunas citocinas leucotácticas para polimorfonucleares y mononucleares. El factor quimiotáctico derivado de linfocitos (LDQF) es una de las citocinas mejor definidas y constituye un excelente quimioatrayente para los mononucleares (Vega, 2008).

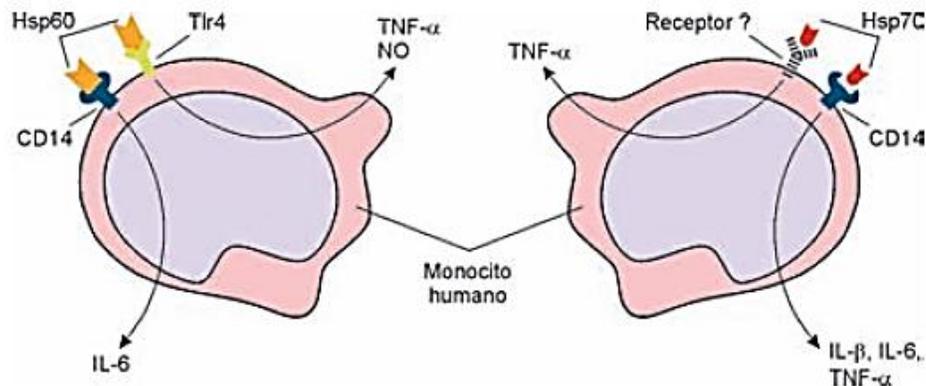


**Figura 13. Mecanismo de autoactivación de los receptores activados por proteasas (PAR).** Tras la escisión proteolítica del extremo N-terminal ( $\text{NH}_3^+$ ) del PAR por tripsina o triptasa (dependiendo del subtipo del receptor), se expone un nuevo resto N-terminal ( $^*\text{NH}_3^+$ ) y se desenmascara la secuencia [-] que autoactiva [-] el receptor acoplado a proteína G. **TM1**: primer dominio transmembranal. **TM7**: séptimo dominio transmembranal. **COO**: grupo carboxiterminal (Barreno, 2008).

Además se ha demostrado que durante la lesión tisular, pueden ser liberadas HSP al compartimiento extracelular y estas presentan una serie de efectos inmunológicos, que incluyen la inducción de secreción de citocinas proinflamatorias y de expresión de moléculas de adhesión por diversos tipos celulares. Recordemos que las HSP (proteínas de choque térmico) son una familia de proteínas cuya expresión incrementa en respuesta a una gran variedad de estímulos metabólicos participando así en la homeostasis celular. La HSP60 activa, en humanos, a las células endoteliales vasculares para expresar selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 (Dotor, 2009). La misma proteína de estrés induce la secreción de IL-6 por células endoteliales, células musculares lisas y macrófagos. De manera similar al LPS de las bacterias Gram negativas, la HSP60 induce la rápida liberación de  $\text{TNF-}\alpha$  y de óxido nítrico (NO) por los macrófagos, así como la expresión de IL-12 e IL-15. Las HSP, en su función extracelular como citocinas, activan a los monocitos y macrófagos a través de los mismos correceptores CD14, que utilizan los LPS bacterianos para incitar una respuesta inmunológica innata (Figuras 14 y 15) (Phillip, 2007).



**Figura 14.** La HSP60 como una molécula proinflamatoria de señalización intercelular (Barreno, 2008).



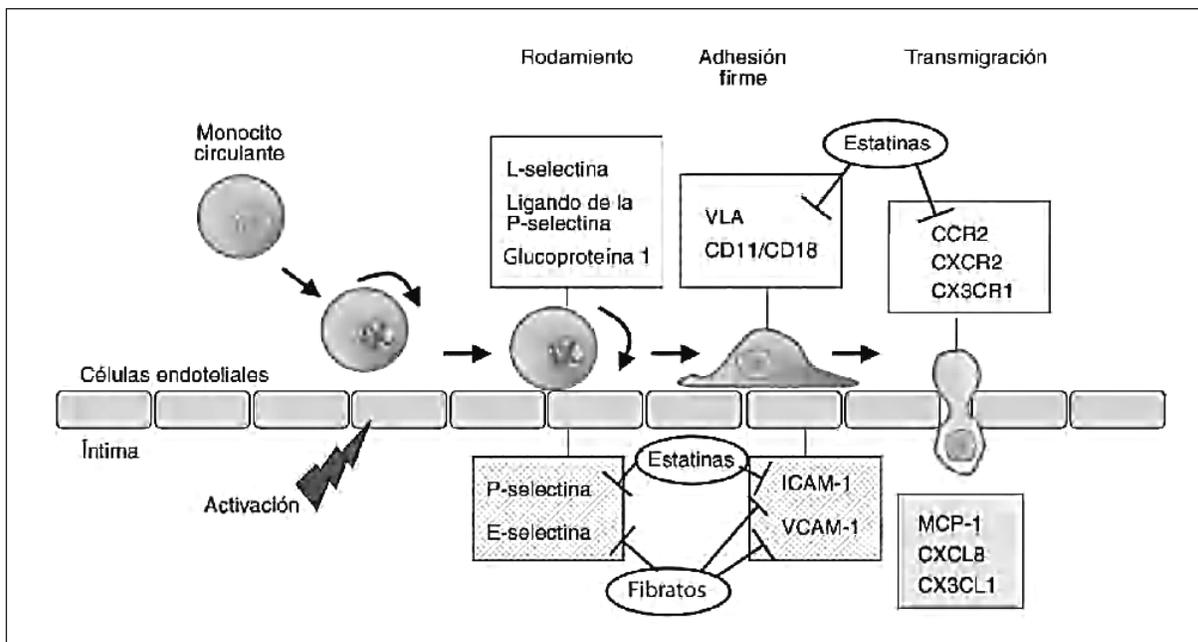
**Figura 15.** Las proteínas HSP60 y HSP70 inducen la secreción de citocinas proinflamatorias por monocitos/macrófagos. La HSP60 estimula la secreción de IL-6 a través del receptor CD14, y se une al complejo del receptor TLR4, del que CD14 es un correceptor, para provocar la expresión de TNF- $\alpha$  y de óxido nítrico sintasa; esta última es responsable de incrementar la producción de NO. La HSP60 también induce la expresión de IL-12 e IL-15, a través de vías no identificadas (Barreno, 2008).

El proceso quimioatrayente mediado por células y moléculas antes mencionadas, continua con la cascada de adhesión monocítica, la cual es una secuencia de acontecimientos de adhesión y activación que concluye con la diapédesis de monocitos; con la finalidad de que tales células ejerzan sus efectos en el foco inflamatorio. En dicha cascada pueden distinguirse, al menos, cinco etapas bien definidas: marginación, captura, rodamiento, anclaje y migración (Laskin, 2009).

- a) La **marginación** es el proceso en el que los monocitos circulantes abandonan el eje del flujo sanguíneo, lo que permite iniciar una serie de interacciones entre las células circulantes y el endotelio (Vega, 2008).
- b) El proceso de **captura** o atamiento representa el primer contacto de un monocito con el endotelio activado. La captura ocurre tras la marginación, que permite mover al monocito hacia una posición próxima al endotelio, lejos del eje del flujo (Campal, 2004). Para que lo anterior se pueda llevar a cabo, es necesario la activación de células endoteliales, la cual es causada por mediadores inflamatorios incrementando la expresión de moléculas (selectinas E y P) de adhesión en estas mismas y de sus ligandos en la superficie de los monocitos. La interacción entre las selectinas y sus ligandos hacen que los monocitos se deslicen rodando lentamente por la superficie del endotelio (Tabla 6) (Campal, 2004 y Pacheco 2011).
- c) El **rodamiento** ocurre a una velocidad similar o menor a la de las células que circulan libremente en el mismo vaso y en la misma posición radial. La velocidad que separa el rodamiento del flujo celular libre se denomina velocidad crítica o velocidad hidrodinámica. El rodamiento facilita la interacción entre las integrinas del monocito (VLA) y el CD11/CD18 con las proteínas de la familia de las inmunoglobulinas expresadas en las células endoteliales, como el ICAM-1 y VCAM-1, mediando la adhesión firme o **anclaje** (Tabla 6) (Pacheco 2011).
- d) Posteriormente, los monocitos **migran** hacia la capa íntima en un proceso estimulado por quimiocinas, tales como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), CXCL8 y CX3CL1, que interactúan con sus respectivos receptores CCR2, CXCR2 y CX3CR1. La MCP-1 es el principal factor encargado del reclutamiento de monocitos. Se ha demostrado que ratones deficientes en MCP-1, o en su receptor, poseen un menor número de monocitos infiltrados, a la vez que una disminución en el desarrollo de las lesiones ateromatosas. Una vez que migran a la íntima se diferencian a macrófagos, en respuesta a factores producidos localmente, como el M-CSF. De forma general, se puede observar el proceso de adhesión y diapédesis en la Figura 16 (Pacheco, 2011).

**Tabla 6. Moléculas involucradas en el rodamiento, adhesión y trans migración de monocitos a través de células endoteliales** (adaptado de Echeverri, 2004).

FAMILIAS	TAMAÑO (kDa)	ADHESIÓN CELULAR
<b>1.- Selectinas</b>		
a. Selectina-E (ELAM-1)	115	PMN, monocito
b. Selectina (GMP-140/PADGEM)	140	PMN, monocito
<b>2.- Inmunoglobulinas</b>		
a. VCAM-1 (INCAM-110)	110	Linfocito, monocito
b. ICAM-1 (CD54)	100	Linfocito, monocito y PMN
c. ICAM-2	46	Linfocito, monocito y PMN



**Figura 16. Rodamiento, adhesión y trans migración de monocitos** (Pou, 2007).

A principios de los 90's ya se había propuesto que PECAM1 (CD31) tenía un papel central durante la trans migración del monocito, pero evidencia reciente indica que CD11 en monocitos humanos e ICAM-I y II en células endoteliales son esenciales para la locomoción de monocitos durante la extravasación. Además, CD62L y CD44 en los monocitos juegan un papel crítico directamente con el tráfico de monocitos circulantes *in vivo* durante la inflamación (Campal, 2004 y Pou, 2007).

Como se había mencionado anteriormente, existen dos subconjuntos de monocitos, y como consecuencia presentan diferencias en las moléculas de adhesión y en la

expresión de receptores de quimiocinas para su reclutamiento. Los monocitos CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> expresan CD62L y CD64 (FC $\gamma$ RI), mientras que los monocitos CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>+</sup> tienen elevados niveles de MHC-II y FC $\gamma$ RII (CD32). Además, los monocitos inflamatorios expresan niveles elevados de CCR2, el receptor para MCP-1, bajos niveles de CCR5 y niveles intermedios de CX3CR1 (receptor para la fractalkina). Los monocitos CD16<sup>+</sup> expresan elevados niveles de CCR5 y CX3CR1 (receptor de la proteína 1a de macrófagos inflamatorios, conocida como MIP-1 $\alpha$ ). En consecuencia, la fractalkina y la MIP-1 $\alpha$  son capaces de inducir la migración transendotelial de células CD16<sup>+</sup>, el reclutamiento de monocitos inflamatorios es principalmente dependiente de MCP-1 (Alegret, 2007 y Pacheco, 2011).

Existe evidencia sustancial que identifica a los monocitos como una llave celular para la iniciación y desarrollo de placas de ateroma (AP). La inhibición de la expresión de moléculas de adhesión, de quimiocinas o sus receptores provoca una menor infiltración de monocitos que, teniendo en cuenta el papel de estas células en la aterosclerosis, puede reducir el desarrollo de lesiones. La figura 16 muestra los puntos de actuación de fármacos de uso clínico (estatinas y fibratos) sobre estas células diana antiateroscleróticas tempranas (Pou, 2007).

4

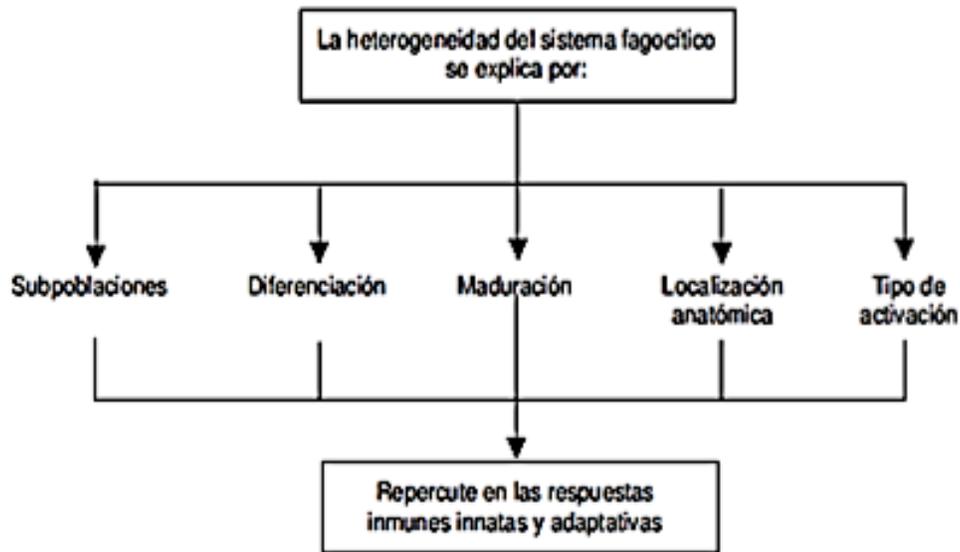
# MACRÓFAGOS



*(Lewis Thomas, 1913-1993)*

#### 4.1. Diferenciación de macrófagos.

Como se describió anteriormente, los macrófagos se originan a partir de células madre hematopoyéticas (HSC), y derivan en su mayoría de monocitos circulantes que se extravasan a los tejidos por el influjo de citocinas y quimiocinas. A pesar de ello, un pequeño porcentaje de macrófagos (aproximadamente 5 % del total en el organismo) derivan de la división local de fagocitos mononucleares tisulares (Scechter, 2009). La heterogeneidad de los macrófagos se genera por diversos factores (Figura 17), los cuales generan variaciones en la morfología (diámetro, granularidad, forma, estructura, etc.), del fenotipo de marcadores de membrana y de las respuestas funcionales que pueden llevar a cabo los macrófagos. Se cree que esta variabilidad obedece a las diversas localizaciones anatómicas donde se pueden alojar, al estado de maduración y diferenciación, y al tipo de activación que reciben estos fagocitos (Tiang, 2009).



**Figura 17. Aspectos implicados en la heterogeneidad del sistema fagocítico mononuclear** (Castaño, 2010).

La diversidad de las funciones y la variación de sus respuestas y fenotipos cuando colonizan diferentes tejidos, son sólo algunos de los elementos por las que se puede apreciar la elevada heterogeneidad de estas células (Smith, 2008).

#### 4.1.1. Citocinas implicadas en la ontogenia de macrófagos.

Las principales citocinas que determinan la supervivencia, diferenciación y quimiotaxis de los macrófagos son GM-CSF, M-CSF e IL-3. El M-CSF es la principal citocina que regula el desarrollo y funciones efectoras de las células del SFM. Es sintetizado constitutivamente por numerosos tipos celulares (macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, células del estroma, etc.), y su concentración en suero oscila entre 3 y 8 ng/mL. Su producción es inducida por la activación de células hematopoyéticas y fibroblastos con GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$  (Sierra, 2010).

La síntesis de M-CSF es regulada de manera específica por cada tejido y sus niveles son elevados en estados de inmunosupresión (embarazo, tumores) con el fin de inducir la formación de fagocitos mononucleares para proteger al organismo frente a infecciones o antígenos extraños (Vereyken, 2011). A diferencia del GM-CSF, esta citocina juega un papel fundamental en el desarrollo mieloide, los ratones M-CSF<sup>-/-</sup> exhiben una generación deficiente de macrófagos, mientras que los ratones GM-CSF<sup>-/-</sup> sólo muestran alterada la maduración de los macrófagos alveolares (Ordoñez, 2007). Las funciones biológicas efectoras del M-CSF son mediadas por un receptor único codificado por el proto-oncogen *c-fms*, un receptor tirosin cinasa. La unión de M-CSF induce la dimerización del receptor y la activación de esta cinasa. Esto lleva a la autofosforilación de residuos específicos de tirosina en el dominio citoplasmático y a la consecuente interacción de los residuos fosforilados con otras proteínas, cada uno iniciando señalizaciones mediante rutas específicas. Recientemente se ha identificado a la IL-34 como un ligando alternativo del receptor codificado por el proto-oncogen *c-fms*, pero con actividad biológica y señales de activación distintas a las de M-CSF (Barreno, 2008 y Vereyken, 2011).

El GM-CSF es una citocina pleiotrópica y es producida por diversas células, incluyendo LT, LB, macrófagos, células cebadas, eosinófilos, neutrófilos y células endoteliales. En condiciones fisiológicas el GM-CSF se encuentra en suero a una concentración entre 20 y 100 pg/mL. El GM-CSF promueve la viabilidad, proliferación y maduración de precursores de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, y sus funciones dependen de su

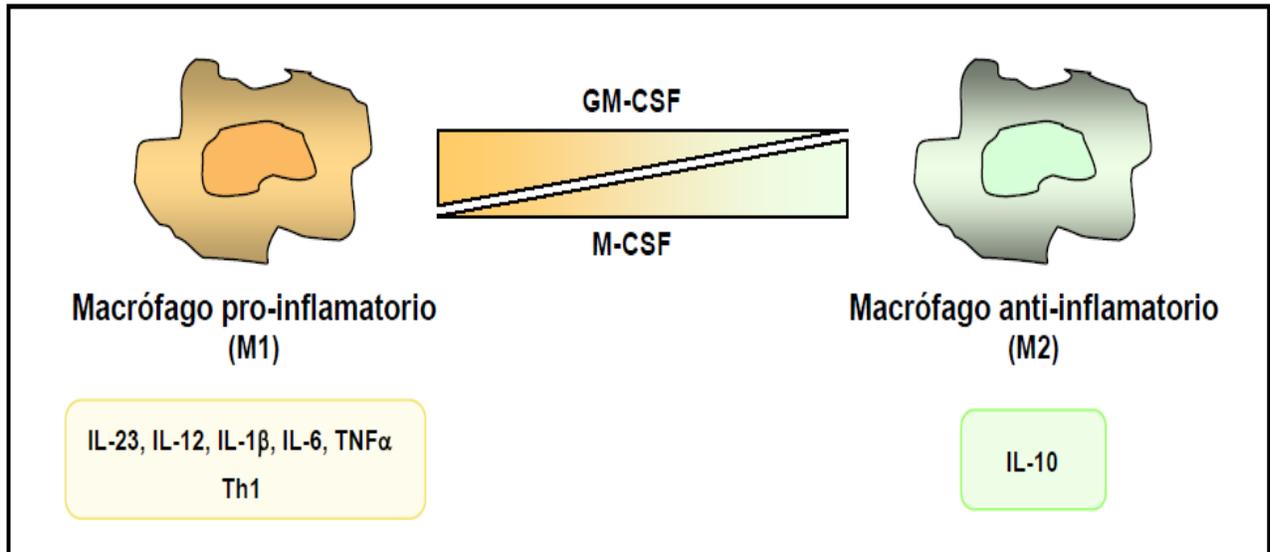
concentración, los efectos en la viabilidad celular requieren menores concentraciones que las necesarias para afectar la proliferación celular (Smtih, 2008). Los efectos biológicos del GM-CSF están mediados por el receptor de GM-CSF que, a diferencia del receptor homodimérico del M-CSF, está compuesto por una cadena  $\alpha$  de unión a GM-CSF, y una cadena  $\beta$  necesaria para la transducción de señales. Este receptor también tiene sitios de unión con IL-3 e IL-5, por lo tanto, esta familia de citocinas se encargan de regular la supervivencia, diferenciación y las activaciones funcionales de las células hematopoyéticas. También el GM-CSF es capaz de controlar las funciones de DC y LT, vinculando así la inmunidad innata y adquirida (Hansen, 2008).

El receptor para GM-CSF, IL-3 e IL-5 es expresado en muy bajos niveles en la superficie de células hematopoyéticas (100 a 1000 por célula) (Hansen, 2008). Cada subunidad  $\alpha$  se une a las citocinas con baja afinidad ( $K_D$ : 0.2-100 pM), pero la presencia de la subunidad  $\beta$  le confiere una elevada afinidad ( $K_D$ : 100 pM), causando la dimerización de ambas subunidades y la activación del receptor, con la consecuente transfosforilación de tirosina sin embargo los mecanismos fundamentales de activación del receptor aún no son claros (Vega, 2008).

#### **4.1.2. Macrófagos generados en presencia de GM-CSF y M-CSF.**

El GM-CSF y M-CSF presentan una modulación cruzada de sus respectivas actividades funcionales: mientras que el M-CSF aumenta la generación de macrófagos en presencia de bajos niveles de GM-CSF, altas concentraciones de esta última impiden el desarrollo de macrófagos mediado por M-CSF, debido a la acción inhibitoria de GM-CSF sobre la expresión del receptor para M-CSF. Aunque los macrófagos humanos derivados de monocitos (MDM) diferenciados en presencia de GM-CSF o M-CSF *in vitro* se consideran equivalentes a los macrófagos residentes en los tejidos en condiciones homeostáticas, ambas citocinas se usan indistintamente en la generación *in vitro* de MDM, dando lugar a poblaciones fenotípica y funcionalmente diferentes (Figura 18).

En presencia de GM-CSF se generan macrófagos, denominados M1, que producen citocinas proinflamatorias (IL-23, IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) en respuesta a infecciones, como *Mycobacterium sp.*, y promueven la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> a tipo Th1 (Correa, 2007).



**Figura 18. Esquema ilustrativo de macrófagos generados en presencia de GM-CSF o M-CSF. Diferencias en la respuesta inmunitaria (Mantovani, 2004).**

A los macrófagos inducidos por M-CSF se les denominan M2 y secretan IL-10 (citocina inmunoreguladora de las APC) en respuesta a estímulos externos, inhiben respuestas Th1, y se han implicado en la inducción de tolerancia. Los macrófagos M2 actúan como moduladores de autoinmunidad, ya que inducen la diferenciación de células T<sub>reg</sub> e inhiben la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17 (Villalta, 2009).

Por lo antes expuesto, los macrófagos M1 y M2 juegan papeles opuestos durante la respuesta inmunitaria, y son considerados como macrófagos pro- y anti-inflamatorios, respectivamente. Del mismo modo, como se había mencionado con anterioridad, el GM-CSF y M-CSF se emplean para la generación *in vitro* de macrófagos a partir de precursores de médula ósea de ratón, y sus propiedades pro- y anti-inflamatorias se ajustan a las de los macrófagos M1 y M2 derivados de monocitos humanos (Silva, 2012).

### 4.1.3. Fenotipo y función de los macrófagos M1 y M2.

Los macrófagos se dividen en subclases según su posición anatómica y fenotipo fisiológico. Anteriormente, se mencionó que existe una regulación cruzada entre M-CSF y GM-CSF durante la diferenciación y maduración de los macrófagos, a consecuencia de esto, los macrófagos generados llegan a presentar diferencias fenotípicas y funcionales. Los macrófagos M2 presentan una morfología elongada en forma de huso, mientras los macrófagos M1 son más redondeados. Por otro lado, los macrófagos M2 presentan mayor expresión de CD14, receptor para M-CSF y del receptor *scavenger* CD163, mientras que los macrófagos M1 expresan mayores niveles de HLA-DQ y HLA-DR (Hansen, 2010).

Respecto a la expresión del receptor de reconocimiento de patrones (PRR), ambos tipos de macrófagos expresan niveles similares de TLR2 y TLR4, y la expresión de DC-SIGN es baja pero significativa en macrófagos M1 y mayor en macrófagos M2. El DC-SIGN (por sus siglas en inglés: molécula de adhesión intracelular 3 no-integrina “específica” de células dendríticas), es un receptor de lectina tipo II, conocido también como CD-209 cuya principal función es regular los procesos de adhesión, tal como la formación de la sinapsis inmunológica con células T, así como participar en la captura de antígenos (Geijtenbeek, 2012).

Desde el punto de vista funcional, ambas poblaciones de macrófagos también se comportan de forma diferente (Tabla 7). Los macrófagos M2 presentan mayor capacidad de fagocitosis mediada por receptores de  $Fc\gamma$ , mayor actividad fungicida debida a la producción de ROS, y mayor producción de  $H_2O_2$  en respuesta a estímulos fagocíticos. Por su parte, los macrófagos M1 tienen mayor capacidad de presentación de antígeno que los macrófagos M2. Aunque ambos tipos de macrófagos son blancos de la infección inicial por HIV-1, convirtiéndose en reservorios virales, los macrófagos M2 tienen mayor capacidad de producción de partículas virales, mientras que los macrófagos M1 inhiben la replicación viral a nivel post-transcripcional (Geijtenbeek, 2012).

Otra de las diferencias existentes es la secreción de quimiocinas. Los macrófagos M2 sólo son capaces de producir CCL18 después de ser estimuladas, mientras que los macrófagos M1 secretan niveles constitutivos de CCL22, CCL17 y CCL18, que se mantienen al ser estimulados. A pesar de que los macrófagos M2 producen niveles bajos de citocinas pro-inflamatorias y altos niveles de IL-10 después de ser estimulados, son capaces de secretar quimiocinas atrayentes de otros tipos celulares (neutrófilos, monocitos y LT), debido a su fenotipo anti-inflamatorio/regulador. En ese sentido, CXCL8 (IL-8) es producida tanto por macrófagos M1 como M2, mientras que sólo los macrófagos M2 secretan constitutivamente CCL2 (MCP-1). A su vez, ambos tipos de macrófagos son capaces de secretar CXCL10, CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) y CCL5 (RANTES) tras ser estimulados con LPS, importante para la respuesta celular durante la inmunidad innata (Tabla 7) (Vereyken, 2011).

**Tabla 7. Características fenotípicas y funcionales de los macrófagos generados *in vitro* en presencia de GM-CSF (M1) o M-CSF (M2) (adaptado de Webster, 2010).**

CARACTERÍSTICAS	M1	M2
<b>Receptores</b>		
FcYR I (CD64)	+	+
FcYR II (CD32)	+	+
FcYR III (CD16)	-	+
Receptor "scavenger" tipo A	+	+
M-CSFR (c-fms)	+	+++
<b>Funciones</b>		
Fagocitosis mediada por FcYR	Débil	Fuerte
Producción de $H_2O_2$	Débil	Fuerte
Sensibilidad de $H_2O_2$	Resistente	Sensible
Actividad catalasa	Alto	Bajo
Susceptibilidad HIV-1	Resistente	Susceptible
Susceptibilidad a <i>M. tuberculosis</i>	Susceptible	Resistente
Producción de IL-10	Débil	Fuerte
<b>Antígenos de superficie</b>		
CD11b	++	++
CD11c	++	++
CD14	-	++
CD71	+	-
CD163	-	+
CD209	-	+
HLA-DR	++	+
HLA-DQ	+	-

Actualmente no está claro si un macrófago al ser estimulado adquiere un fenotipo que conserva durante su vida funcional, por lo que existirían *in vivo* subpoblaciones de macrófagos con estados de activación definidos, o si el patrón de activación de los

macrófagos cambia de manera constante de acuerdo a los estímulos que encuentren, lo que generaría un amplio rango de fenotipos no estables representantes de una activación variable (Vereyken, 2011).

#### **4.1.4. Activación de macrófagos (clásica y alternativa).**

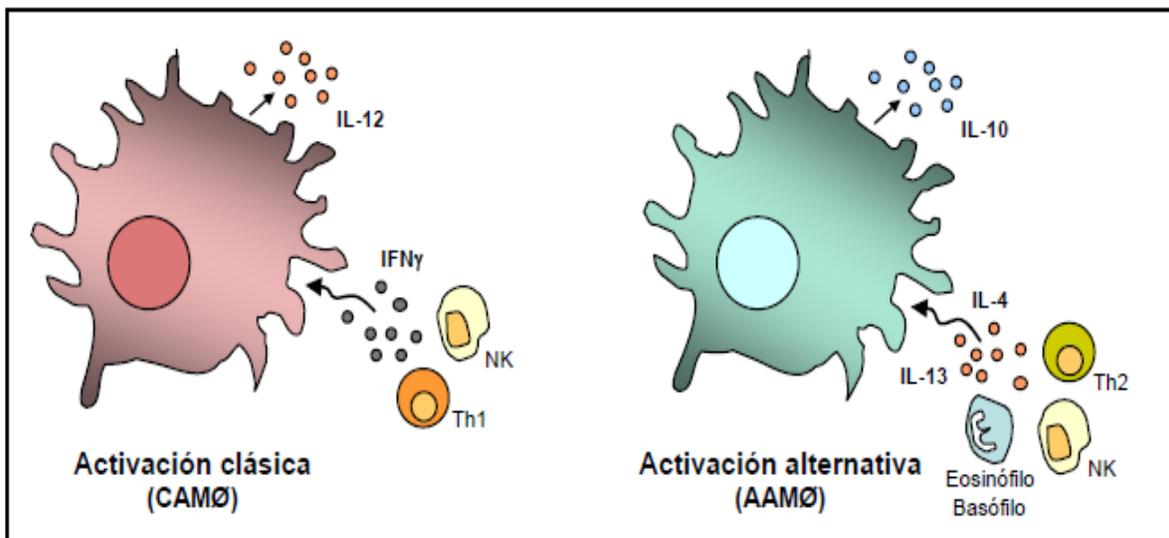
Los macrófagos juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, debido a que actúan como primera barrera de defensa, al detectar y eliminar partículas “extrañas” mediante la fagocitosis o secreción de enzimas, citocinas o producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), por lo tanto su activación debe ser regulada de tal manera que sus funciones sean benéficas para el mantenimiento homeostático del organismo (Steinman, 2006).

La variedad de estímulos para la activación/desactivación de macrófagos, combinada con la heterogeneidad y plasticidad de los macrófagos residentes en tejidos en condiciones homeostáticas, permite la existencia de numerosos estados de activación de macrófagos. Actualmente se sabe que los macrófagos se pueden activar por dos distintas vías: clásica y alternativa, cada una definirá la función que tendrá el macrófago (Sierra, 2010).

El IFN- $\gamma$  producido por células Th1, LT CD8<sup>+</sup> y células NK, convierte a los macrófagos en células con elevada capacidad citotóxica, microbicida (especialmente de patógenos intracelulares) y anti-proliferativa. La adquisición de estas propiedades es debida a la producción de mediadores tóxicos (ROS, RNS) y citocinas pro-inflamatorias. Este tipo de activación, denominada clásica (CAM $\Phi$ , M1), da lugar a macrófagos que secretan altos niveles de IL-12 e IL-23 y muy bajos niveles de IL-10 en respuesta a *Mycobacterium sp.*, y promueven fuertes respuestas inmunitarias Th1 (recordemos que este tipo de respuesta es celular) (Figura 19) (Vereyken, 2011).

Las funciones inflamatorias y citotóxicas de los macrófagos activados contribuyeron a la percepción de que sólo citocinas Th1 promovían la activación de macrófagos, mientras que citocinas de tipo Th2 (respuesta humoral) las bloqueaban o desactivaban; sin

embargo, además de inhibir respuestas Th1, las citocinas Th2 provocan un aumento de las funciones de los macrófagos como lo es la presentación de antígeno, reparación tisular y capacidad endocítica. Por ello, los factores que inhiben la generación y actividad de los CAM $\Phi$  (citocinas Th2 como IL-4 e IL-13, citocinas desactivadoras como IL-10 y TGF- $\beta$ , hormonas como glucocorticoides y la vitamina D3), e incluso las células apoptóticas, han sido agrupados como inductores de una forma “alternativa” de activación de macrófagos (AAM $\Phi$ , M2). Los AAM $\Phi$  producen grandes cantidades de IL-10 y TGF- $\beta$  y niveles muy bajos de IL-12 bajo estimulación, y pueden presentar funciones inmunosupresoras e inhibir la proliferación de LT (Figura 19) (Hirose, 2011).



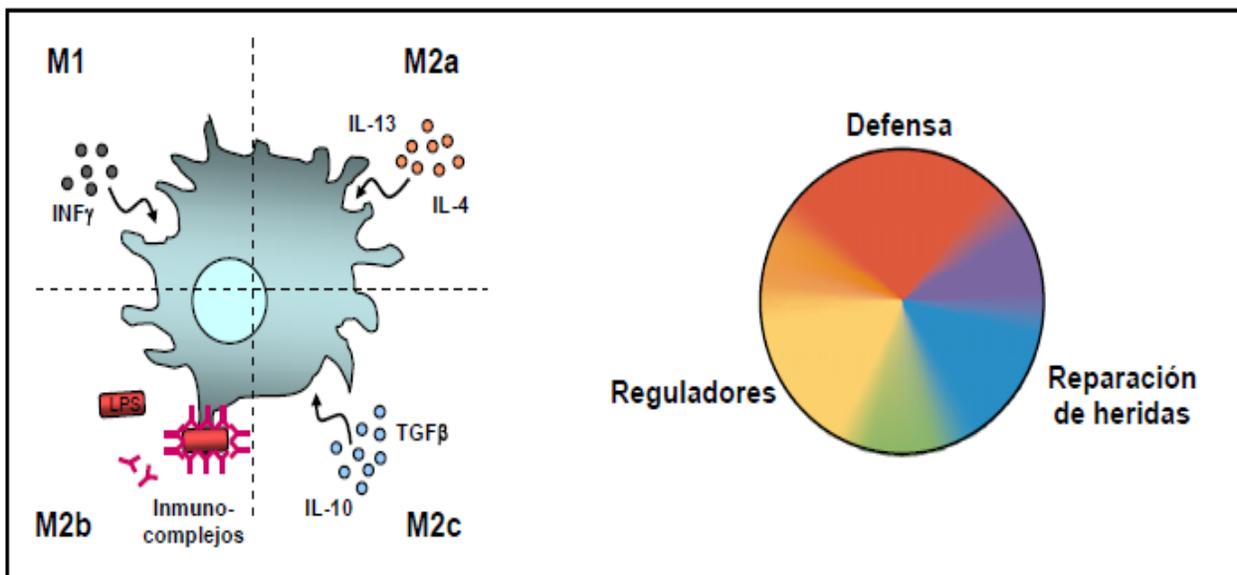
**Figura 19. Tipos de activación de macrófagos.** Representación esquemática de la activación de macrófagos mediante estimulación con IFN- $\gamma$  (activación clásica) o citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 (activación alternativa) (Meléndez, 2010).

Las diferencias en las funciones de CAM $\Phi$  y AAM $\Phi$  han sido demostradas en numerosos ensayos *in vitro*, donde los AAM $\Phi$  inducen mayor proliferación celular y deposición de colágeno de células fibroblásticas e inhiben la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos (Sierra, 2010). Al mismo tiempo, los AAM $\Phi$  contribuyen a la vascularización *in vivo* y exhiben actividad angiogénica *in vitro*, similar a las células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC) maduras en presencia de citocinas como IL-10, TGF- $\beta$ , o glucocorticoides (Vereyken, 2011).

Debido al variable comportamiento de los AAMΦ, se han clasificado las formas de activación alternativa de acuerdo con el estímulo inductor:

- Los macrófagos estimulados por las citocinas Th2 IL-4/IL-13 son denominados M2a.
- Los activados por complejos inmunes y ligandos de TLR son denominados M2b.
- Los macrófagos activados en presencia de IL-10 son denominados M2c (Figura 20) (Meléndez, 2010).

Recientemente se ha propuesto otra clasificación de macrófagos activados de acuerdo con sus funciones en el mantenimiento de la homeostasis: macrófagos involucrados en la defensa del organismo (M2a), en reparación de heridas (M2c) y en regulación inmunitaria (M2b); sin embargo, es preciso enfatizar que además de estos tres grupos es posible definir numerosos estados funcionales intermedios, lo que avala la existencia de un amplio rango de estados de activación de macrófagos (Figura 20) (Sierra, 2010).



**Figura 20. Propuestas de clasificación de macrófagos activados.** Los macrófagos polarizados se pueden clasificar en función del estímulo de activación (izquierda) o de su función efectora primordial (derecha). Los tres colores primarios (rojo, amarillo, azul) representan las tres poblaciones de macrófagos definidas, mientras que los colores secundarios representan macrófagos con funciones intermedias (Sierra, 2010).

#### **4.1.5. Características fenotípicas de macrófagos activados.**

Los macrófagos activados presentan diferentes propiedades fenotípicas y funcionales en base al estímulo de activación. Aunque los macrófagos AAM $\Phi$  (M2) exhiben niveles moderados de expresión de moléculas de adhesión (CD11a, CD54, CD58) y coestimuladoras (CD40, CD80, CD86) similares a los CAM $\emptyset$  (M1), la activación alternativa de macrófagos en respuesta a IL-4 e IL-13 va unida a la adquisición de un repertorio de receptores fagocitarios característicos. Estos receptores dotan a los macrófagos M2 de potentes actividades endocitotóxicas y fagocíticas, y entre ellos son destacables:

- El receptor de manosa (MR1, CD206), cuya señalización intracelular está asociada a la producción de IL-10, la expresión de IL-1R $\alpha$ , y a la inhibición de la producción IL-12 en respuesta a endotoxina.
- El receptor “scavenger” 1 de macrófagos (MSR1, CD204), con un claro papel en el reconocimiento y eliminación de lipoproteínas.
- El receptor de  $\beta$ -glucanos Dectin-1, con especificidad por glucanos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6, típicos de hongos y algunas bacterias, y que colabora funcionalmente con TLR2 en la respuesta inflamatoria anti-fúngica. (Ginderachter, 2008).

De manera esquemática, en la Figura 21 se presenta la distribución de receptores en M1 y M2.

##### **4.1.5.1. Uso de la expresión génica para el control del metabolismo celular como marcador de M1 y M2.**

La expresión de genes que controlan el metabolismo celular también se utiliza para discernir entre los diferentes tipos de macrófagos activados. Así, la expresión de genes que participan en el metabolismo de la arginina, permite diferenciar CAM $\emptyset$  y AAM $\emptyset$  en ratón, pero no en macrófagos humanos. La arginasa 1 (Arg-1) es un marcador prototípico de activación alternativa, ya que su expresión es dependiente de IL-4/IL-13 (M2), mientras que la óxido nítrico sintasa (iNOS) es inducida por IFN- $\gamma$  (M2). Los CAM $\emptyset$  metabolizan arginina vía iNOS, generando NO, que posee elevada actividad microbicida. Por el contrario, la expresión de Arg-1 permite a los AAM $\emptyset$  producir

poliaminas y prolina, que son esenciales para la proliferación celular y la producción de colágeno, respectivamente. Otros marcadores de AAMØ en ratón, y que carecen de homólogos en humanos, son los miembros de la familia quitinasa Ym1 y Ym2 (Chi3I3 y Chi3I4), y Fizz1, involucrado en el metabolismo de lípidos (Correa, 2007).

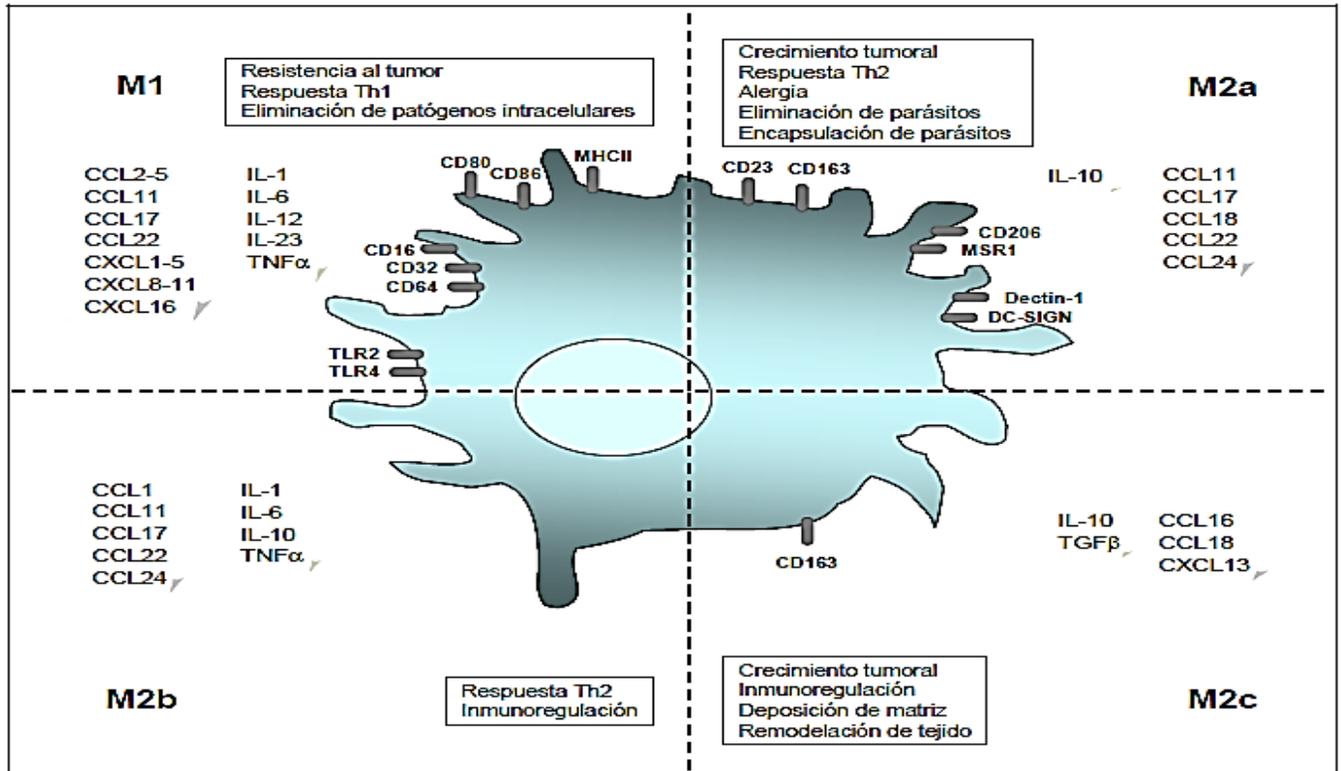


Figura 21. Características fenotípicas y funcionales de macrófagos polarizados en función del estímulo de activación (Geijtenbeek, 2012).

La polarización del macrófago hacia un fenotipo alternativo lleva asociado un aumento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, especialmente de aquellos implicados en la captación y oxidación de ácidos grasos. Así, además de Fizz1, la Stab-1 y la lipoxigenasa ALOX15 presentan mayor expresión en AAMØ. A diferencia de AAMØ, los CAMØ sobreexpresan genes involucrados en el metabolismo del colesterol como ABCA1 y apolipoproteínas L (APOL1-3,6), involucrados en su transporte y en el desarrollo de aterosclerosis (Villalta,2009). A su vez, genes que codifican para las enzimas implicadas en el metabolismo de mediadores lipídicos (eicosanoides, leucotrienos, esfingosina y ceramida) también se expresan diferencialmente entre CAMØ y AAMØ (Hirose, 2011).

Otro marcador significativo es el receptor PPAR $\gamma$ , y alguno de sus genes blanco (FABP4), los cuales incluyen dentro de los genes con mayor expresión en AAM $\emptyset$ , ya que IL-4 es un inductor de este receptor y de sus activadores metabólicos. Los ratones deficientes en PPAR $\gamma$  tienen disminuidos los niveles de mRNA y la actividad de Arg1, por lo que no presentan macrófagos con fenotipo alternativo y, dado su papel en el metabolismo de ácidos grasos, tienen mayor tendencia a la obesidad. Además, se ha descrito a PPAR $\gamma$  como regulador negativo de la activación clásica del macrófago (Sierra, 2010). Por tanto, PPAR $\gamma$  regula las respuestas dependientes de IL-4, y es requerido para la adquisición y mantenimiento del fenotipo alternativo en macrófagos activados. Mientras que PPAR $\gamma$  es un factor crítico para la activación alternativa inducida por IL-4, la activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B, STAT-1 y AP-1 son esenciales para la activación clásica del macrófago (Pacheco, 2011).

#### **4.2. Poblaciones de macrófagos en tejidos y su participación en la reparación tisular.**

Los macrófagos maduros se encuentran estratégicamente ubicados en todo el cuerpo y se encargan de la vigilancia inmunológica. Constantemente examinan su entorno en busca de signos de daño tisular o de invasión de organismos, y están preparados para estimular a los linfocitos y otras células del sistema inmune para responder cuando las señales de peligro son fagocitadas o detectadas por receptores de su superficie celular (Goasgen, 2009).

Una característica principal de los macrófagos es su elevada heterogeneidad y plasticidad funcional, la cual, puede ser reflejada por su especialización en sus diferentes localizaciones anatómicas. Los macrófagos localizados en tejidos que están en contacto con el entorno exterior (pulmón, placenta, mucosas intestinales, etc.) se encuentran continuamente expuestos a patógenos y desafíos ambientales. Por ello existen mecanismos de inhibición “temporal” de las funciones de estos macrófagos, lo que evita daños colaterales en el tejido y permite que sólo se generen reacciones pro-inflamatorias cuando son absolutamente requeridas (Shechter, 2009).

Los macrófagos peritoneales, y los que están situados en el intestino son ejemplos de macrófagos que han desarrollado estrategias para regular a la baja sus funciones efectoras. Por ejemplo, los macrófagos del tracto digestivo se encuentran estratégicamente localizados en la lámina propia, y en tejidos linfoides secundarios asociados al sistema digestivo, como amígdalas y placas de Peyer. Funcionalmente, los macrófagos intestinales carecen de actividad presentadora de antígeno, pero poseen gran capacidad fagocítica y bactericida (Shechter, 2009). Estas células tienen una producción reducida de citocinas pro-inflamatorias debido a la inhibición de NFκB por el TGF-β liberado por las células del estroma. Este estado de falta parcial de respuesta a estímulos externos ha sido definido como “anergia inflamatoria”, y explica la incapacidad de los macrófagos intestinales de mediar en la inflamación de la mucosa. De hecho, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal se han descrito alteraciones en la vía de señalización de TGF-β, lo que hace que un gran porcentaje de macrófagos sean capaces de liberar citocinas pro-inflamatorias. En consecuencia, los macrófagos intestinales son un claro ejemplo de macrófagos anti-inflamatorios (M2) *in vivo* (Laskin, 2009).

Además de su participación contra las infecciones, los macrófagos residentes también están involucrados en el mantenimiento de los tejidos, contribuyendo crucialmente en los distintos pasos de la reparación tisular. Se sabe que, durante la reparación de heridas se pueden identificar tres fases:

1. *Inflamatoria*: se lleva a cabo la liberación local de células y compuestos transportados por la sangre (citocinas), así como la activación del sistema de coagulación.
2. *Proliferativa*: se forma tejido nuevo gracias al crecimiento, a la migración celular y por la participación de diversas proteínas de adherencia.
3. *Remodelación tisular*: desarrollo de un tejido estable, similar al existente previo a la lesión, conocido como cicatriz (Marinovic, 2008).

En cada uno de estos mecanismos los macrófagos colaboran para que se puedan llevar a cabo. La fase inflamatoria inicia inmediatamente después de la lesión tisular y puede

ser dividida en dos eventos: vascular y celular. El vascular incluye los mecanismos de hemostasis (participan los macrófagos al exponer el factor tisular sintetizado por estas células para colaborar con la hemostasia a través de la vía extrínseca); el celular implica la llegada y participación de leucocitos al área lesionada. La llegada de granulocitos y monocitos complementa la fase inflamatoria. Son atraídos por: TGF- $\beta$ , PDGF, IL-8, los productos de degradación del fibrinógeno, la fibrina, el colágeno y la elastina, y las sustancias liberadas por los mastocitos y macrófagos (TNF, histamina, proteasas, leucotrienos y citocinas) (Marinovic, 2008). Los neutrófilos son las primeras células en llegar para remover detritus celulares (residuos de origen orgánico), partículas extrañas y bacterias; posteriormente la remoción de los neutrófilos reclutados se dará por apoptosis y/o fagocitosis por macrófagos (Rodriguez, 2010).

Los monocitos arriban poco después y reemplazan a los neutrófilos. Son atraídos por fibronectina, elastina, C3a, C5a, trombina, TGF- $\beta$ , PDGF, TGF- $\alpha$ , VEGF, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento nervioso (NGF), TGF- $\beta$  y la proteína quimioatrayente de macrófagos (MIP)-1 $\alpha$ . En los tejidos se transforman en macrófagos y desempeñan un papel similar al de los neutrófilos. Participan en la última parte de la fase inflamatoria, regulando la llegada de otros monocitos y fibroblastos, liberando factores angiogénicos (proceso favorecido por la hipoxia local) y de crecimiento (PDGF, FGF, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), TGF- $\alpha$  y  $\beta$ , los cuales son importantes para la migración y proliferación celular, así como en la formación de la matriz extracelular. Además, la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) por los macrófagos perpetúa el proceso inflamatorio. Los macrófagos, una vez unidos a la matriz extracelular, sufren un cambio fenotípico, y pasan de comportarse como células inflamatorias a comportamiento de células reparadoras, que liberan citocinas y factores de crecimiento (TGF  $\alpha$  y  $\beta$ , PDGF, FGF y IGF-1) con un importante papel en la neoformación tisular; siendo los procesos descritos los que permiten la inducción de la angiogénesis y la formación de tejido de granulación, preparando el lecho de la lesión para la siguiente etapa fisiológica (Benaviez, 2008).

En la fase proliferativa, la matriz extracelular provisional comienza a ser reemplazada por tejido de granulación (tejido conectivo fibroso que perfunde y reemplaza un coágulo de fibrina). Este cambio morfológico se atribuye a la invasión de capilares que sirven de base a la aparición del tejido de granulación y a la llegada de células que permanecerán en la dermis reparada. Los eventos principales durante esta fase son la reepitelización, la angiogénesis y la fibroplasia. En la reepitelización se restablece la unión dermoepidérmica, de la membrana basal, la dermis y la neoepidermis, proceso mediado por queratinocitos mediante la formación de uniones intracelulares y por la formación de fibras de anclaje. La angiogénesis se activa ante la lesión y es regulada principalmente por células endoteliales y fibroblastos, así como por citocinas liberadas por macrófagos, las cuales tienen como finalidad promover la formación de nuevos vasos sanguíneos, ya que estos proveerán de nutrientes y oxígeno al tejido en crecimiento. En la angiogénesis, los macrófagos participan liberando factores como el: FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos), TGF- $\beta$  e IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), que en conjunto promueven la migración de células endoteliales y la proliferación de fibroblastos, para que estos últimos comiencen a sintetizar una gran cantidad de moléculas de matriz extracelular (Marinovic, 2008).

En la fibroplasia hay migración, proliferación y producción de nuevo colágeno y otras proteínas de matriz por acción de los fibroblastos. Los fibroblastos fabrican colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAG) y factores de crecimiento. Posteriormente los fibroblastos sufren una transformación fenotípica a miofibroblastos para participar en la contracción de la herida; los miofibroblastos extienden pseudópodos y las bandas de actina se ligan a la fibronectina extracelular unida al colágeno fibrilar, arrastran las fibras de colágeno a la célula y producen entonces la contracción.. Una vez ha finalizado este proceso, los fibroblastos entran en apoptosis (Rodríguez, 2010).

Finalmente se presenta la fase de remodelación, en la que se desarrolla el depósito de matriz permanente y los subsecuentes cambios con el tiempo. Se reemplaza el tejido de granulación rico en colágeno tipo III por colágeno tipo I (mecanismo mediado por miofibroblastos). Una de las características de la remodelación tisular es el cambio de la

composición de la matriz extracelular. Después de un año o más, la dermis retorna gradualmente al fenotipo existente previo a la lesión, con predominio de colágeno tipo I. Cuando la herida se cierra inicia la degradación del colágeno tipo III y la síntesis de colágeno tipo I. En la degradación participan las MMP (metaloproteinasas) secretadas por células endoteliales. Las MMP son un grupo de enzimas de una gran familia de proteínas dependientes del Zinc. Otro de los cambios observados ocurre con la vascularización y el ambiente acelular. Una cicatriz reciente se caracteriza por una relativa alta densidad de capilares, mientras una cicatriz antigua es menos vascular (apoptosis de células endoteliales) y tiene entonces un color menos rojo. En la figura 22 se demuestra de manera esquemática los mecanismos de la reparación tisular (Benavidez, 2008).

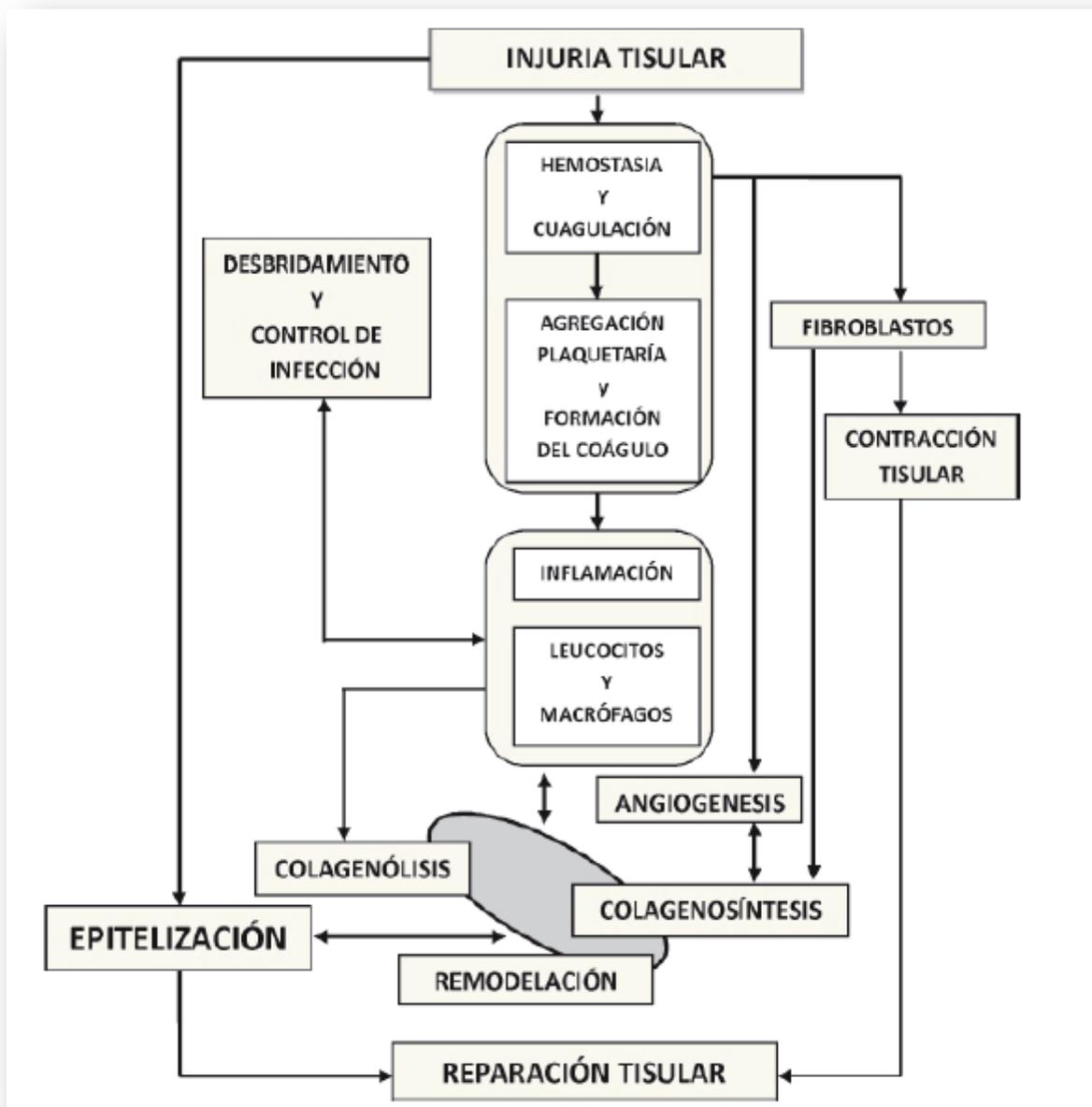
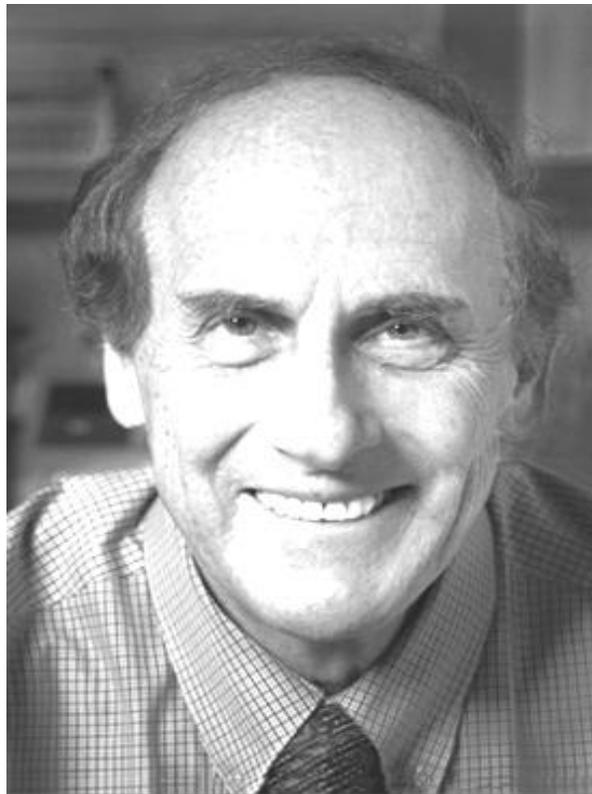


Figura 22. Mecanismos involucrados durante la reparación tisular (Benavidez, 2008).

# 5

## CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC)



*(Ralph Marvin Steinman, 1943-2011)*

### 5.1. Origen y tipos de células dendríticas.

El origen de las células dendríticas (DC) es controvertido debido a ciertas similitudes con monocitos/macrófagos en cuanto a distribución, morfología, fenotipo y actividad enzimática. En primeras instancias se consideró que las DC eran de origen mieloide (Hume, 2008). Estudios posteriores han demostrado que se pueden generar distintos tipos de DC a partir de progenitores de varios linajes leucocitarios, conociéndose entonces como células dendríticas de origen linfoides y mieloides. En ratón, progenitores que expresan un porcentaje de CD4 bajo, y que dan lugar a LB, LT y NK, son capaces de reconstituir la población de células dendríticas CD8 $\alpha^+$ . Esto llevó a considerar a esta subpoblación de origen linfoide, y la subpoblación CD8 $\alpha^-$ , de origen mieloide. Sin embargo, se ha conseguido generar *in vitro* células dendríticas CD8 $\alpha^+$  y CD8 $\alpha^-$  a partir del mismo progenitor “CD4 bajo”, y ambas subpoblaciones pueden proceder tanto de un linaje linfoide como mieloide (Aghaallaei, 2010).

Las DC constituyen un grupo de células presentadoras de antígenos, las cuales tienen diferentes nombres dependiendo de su localización: las células dendríticas foliculares asociadas a las áreas de LB en los tejidos linfoides, las células veladas en los vasos linfáticos aferentes, las células interdigitantes asociadas a las áreas de LT en el timo, los dendrocitos dérmicos en la dermis y las células de Langerhans en la epidermis (LC). En órganos no linfoides se han descrito DC en corazón, hígado, pulmón, intestino y piel (Wittamer, 2011).

En los últimos años, el interés en la evaluación y caracterización de las DC, y su papel en la respuesta inmune frente a diversos agentes infecciosos y distintas enfermedades, ha aumentado notablemente debido a la evidencia acerca del papel que las DC juegan en el inicio, desarrollo, dirección de la respuesta inmune y el control de patologías (Swiecki, 2011).

Las DC son un conjunto bastante heterogéneo de células que varían en fenotipo, localización anatómica y función; sin embargo, como se mencionó con anterioridad, la mayoría de estas células se puede distinguir por expresar niveles elevados de la

molécula CD11c y MHC-II. Las DC mieloides expresan en su superficie CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/CD123<sup>-</sup> y MHC-II, en general secretan IL-12 en respuesta a estímulos de lipopolisacáridos. Se distribuyen prácticamente en todos los tejidos y se denominan de formas diversas dependiendo de su localización tisular. Las DC mieloides circulantes representan solamente un 0.5 % de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales (Toro, 2009).

Por el contrario, las DC plasmacitoides o linfoides expresan CD11c<sup>-</sup>/B220<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup> y niveles variables de MHC-II, se caracterizan por una abundante secreción de IFN- $\gamma$  en respuesta de varios tipos de patógenos intracelulares como los virus encapsulados. Proceden de progenitores distribuidos en el timo y en áreas T de los órganos linfoides secundarios, y residen en nódulos linfáticos, bazo, timo, médula ósea y sangre periférica (Toro, 2009). Las DC plasmacitoides son importantes mediadores de la inmunidad anti-viral, produciendo grandes cantidades de IFN- $\alpha$  al ser estimuladas. En la Tabla 8 se muestra marcadores de superficie que son útiles para distinguir las DC mieloides de las linfoides (plasmocitoides) (Wittamer, 2011).

**Tabla 8. Marcadores de superficie de DC mieloides y plasmacitoides** (Wittamer, 2011).

DC Mieloides	DC Plasmocitoides
CD11c (+)	CD11c (-)
CD11b (+)	CD11b (-)
CD123 (-)	CD123 (+)
BDCA-2 (-)	BDCA-2 (+)
CD4 (+/-)	CD4 (+)
CD45RA (-)	CD45RA (+)
CD1c (+)	CD1c (-)

Recientemente se ha descrito un tercer tipo, las DC asesinas productoras de Interferón (IKDC). Las IKDC pueden secretar IL-12, IFN- $\gamma$  o IFN del tipo I dependiendo del estímulo, y se distinguen por expresar una combinación de marcadores de moléculas membranales característicos de DC y de células NK que incluyen a CD11c<sup>+</sup>/CPHII<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/CD49b<sup>+</sup>. La naturaleza de las IKDC es polémica, algunos sugirieren que en realidad son células NK activadas, mientras que otros sostienen que

su ontogenia difiere de las NK, ya que estas últimas son de origen linfoide mientras que en las IKDC la expresión de CD11c+ indica su naturaleza mieloide (Chihara, 2010).

Acorde a su estadio de maduración se pueden identificar a dos grupos, las DC inmaduras (DCi) que actúan como “vigilantes”, caracterizándose por su alta capacidad de internalizar microorganismos por medio de procesos como la fagocitosis. Luego del encuentro de una DCi con señales de “alerta” mediado por sus PRR, por ejemplo, productos derivados de patógeno (LPS) o citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ ), así como la interacción CD40/CD40L, inducen una serie de cambios a nivel fenotípico y funcional, dando lugar en la mayoría de los casos a unas DC de fenotipo maduro (DCm) (Bohem, 2010).

El fenotipo de las DCi se caracteriza por la expresión de grandes cantidades de receptores de quimiocinas inflamatorias, que les permiten extravasarse a los tejidos inflamados y por una baja expresión de moléculas coestimuladoras, de adhesión, de MHC y marcadores específicos de DC. La maduración de las DC es un complejo proceso que conduce a la diferenciación final de las DC, transformándolas desde unas células escasamente inmunoestimuladoras que funcionan como vigilantes periféricos que capturan antígenos, en las más potentes células estimuladoras de LT inexpertos (Bohem, 2010). Las DC maduras (DCm) se caracterizan por presentar una reducción en su capacidad fagocítica, sin embargo, a diferencia de las DCi, expresan altas cantidades de moléculas coestimuladoras y otras moléculas involucradas en la presentación de antígenos (Cuellar, 2004). Luego de su activación, las DCm migran hacia los ganglios linfáticos, donde presentan eficientemente los antígenos procesados derivados de patógeno, a los LT en contexto de las MHC. Las DC, así como otras células con actividad fagocítica tienen la capacidad de secretar diversas citocinas implicadas en diversos procesos como la inflamación así como en el desarrollo de respuestas no específicas durante el inicio de la infección (Bohem, 2010).

## 5.2. Plasticidad funcional y variabilidad de linajes para la maduración de DC.

Se han propuesto dos modelos para explicar la diferenciación de las DC a partir de precursores hematopoyéticos. Uno postula un único linaje de precursores de DC dotado de plasticidad funcional, mientras que el otro defiende la existencia de varios linajes de precursores de DC funcionalmente diferentes. Ambos modelos definen tres estados de maduración: precursores de DC, DC inmaduras (DCi) y DC maduras (DCm). Para comprender las funciones de las DC, deben de entenderse sus diferentes estadios de maduración (Aguin, 2012).

Los precursores de DC migran de la médula ósea y circulan por la sangre hasta lugares específicos del organismo donde actúan como vigilantes del sistema inmune, movilizándose hacia el sitio donde se produzca un estímulo inflamatorio, en respuesta a una serie de quimiocinas como MIP1 $\alpha$  (proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 $\alpha$ ), MCP (proteína quimiotáctica para monocitos), IL-8 y RANTES ( CCL5 quimiocina de la subfamilia CC o  $\beta$ - quimiocina), estas quimiocinas se unen a sus respectivos receptores CCR1 (Receptor de CC quimiocinas tipo 1), CCR2, CCR5 y CCR6 expresados en el endotelio vascular; en segundo lugar, dependiendo del estado de maduración de la CD, disminuye la expresión de dichos receptores y aumenta la expresión de CCR7, el mediador principal de la movilización de las CD hacia los órganos linfoides secundarios, el cual se une a sus ligandos MIP3 $\beta$  y CCL21 (quimiocina de la subfamilia CC o  $\beta$ - quimiocina, también conocida como 6-Ckine) (Aguin, 2012).

La función principal de las DCi es la captura antigénica. Detectan señales de peligro o alarma (microorganismos patógenos, células infectadas, células muertas o sus productos) a través de varios mecanismos: a) macropinocitosis; b) endocitosis mediada por PRRs (Receptores de Reconocimiento de Patógenos) como tipo lectina (receptor de manosa, DEC-205), o receptores Fc $\gamma$  I (CD64) y II (CD32); y c) fagocitosis de fragmentos antigénicos.. Ya en el interior de las DC, los antígenos proteicos son degradados a péptidos que se unirán a las MHC-I o MHC-II, y serán transportados a la superficie celular para el posterior reconocimiento por LT antígeno-específicos. Los antígenos proteicos endógenos, procesados a través de la vía del MHC I, son

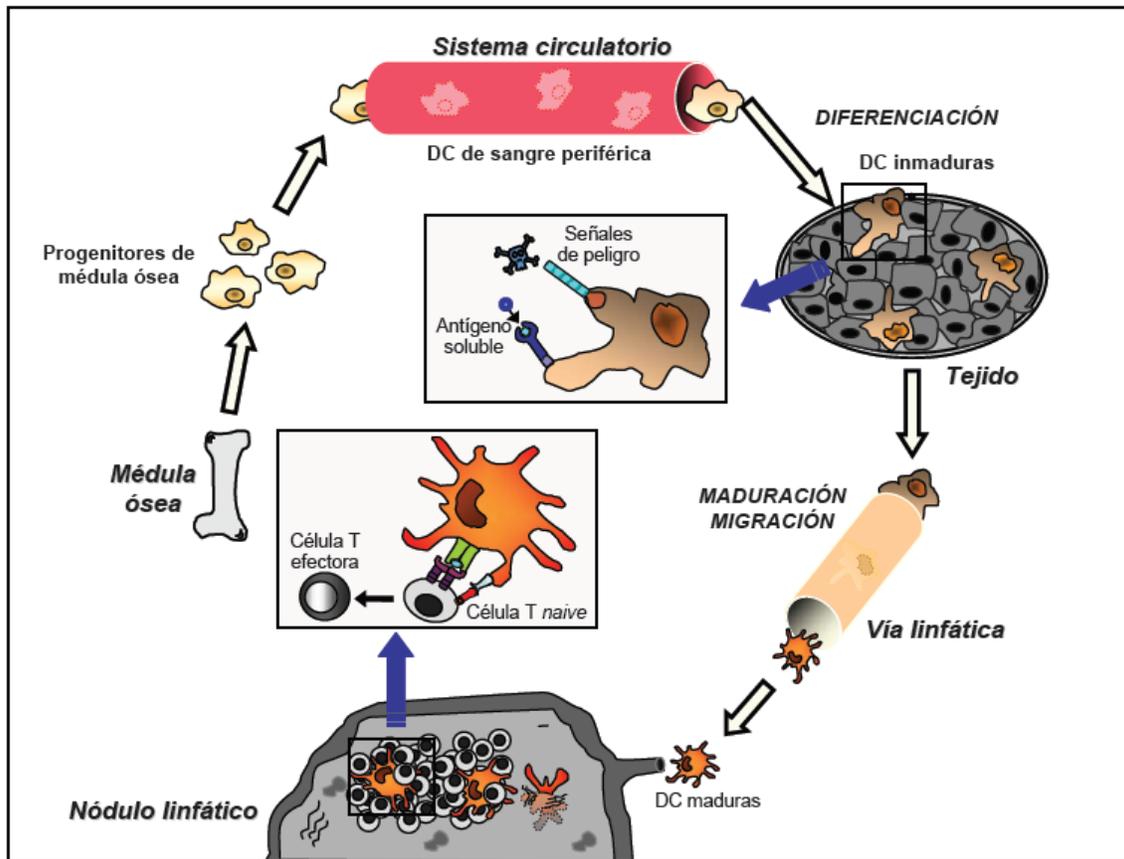
primeramente ubiquitinados y degradados en péptidos por el proteosoma en el citosol. Posteriormente son transportados al RE por moléculas transportadoras asociadas con el procesamiento antigénico (TAP), donde son cargados en el MHC-I. Los complejos MHC I-péptido son llevados desde el RE a la membrana celular a través de la red trans-Golgi para la presentación a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Granados, 2008).

Los antígenos proteicos exógenos son procesados en endosomas que se fusionan con lisosomas portadores de proteasas, responsables de la degradación de las proteínas en péptidos que se unirán a MHC-II. Los complejos MHC II-péptido son transportados por túbulos especializados a la superficie celular, donde se presentarán a linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estas proteínas exógenas también pueden ser procesadas por las DC a través del MHC-I, fenómeno conocido como “presentación cruzada”; esto permite la activación de una respuesta inmune tanto de linfocitos CD4<sup>+</sup> como de LT CD8<sup>+</sup> ante antígenos exógenos (Velázquez, 2011).

Los antígenos lipídicos, tanto los expresados en patógenos (por ejemplo, micolatos de micobacterias) como los presentes en tejidos propios (esfingolípidos, fosfatidil inosítidos), son presentados por las DC a través de la molécula CD1, que heterodimeriza con la β2-microglobulina. El procesamiento de estos antígenos lipídicos sobre las diferentes moléculas CD1(a-d) se realiza en compartimentos intracelulares especializados. (Swiecki, 2011).

Con la maduración las DC adquieren una gran motilidad y pierden su capacidad de capturar antígenos al disminuir la expresión de receptores de fagocitosis y endocitosis (Steinman, 2006). Las DCm optimizan el procesamiento de antígenos aumentando la expresión de los componentes de la maquinaria enzimática responsable del proceso, y adquieren la capacidad de presentar antígenos y estimular a los LT inexpertos tras el incremento en la expresión de moléculas del MHC y de moléculas de adhesión y coestimulación (CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86). La mayoría de estos marcadores ya están presentes en bajos niveles en las DCi; en cambio, el CD83 está ausente en las DCi y sirve como marcador para distinguir las DCi de las DCm. (Serrano,

2007). También durante el proceso de maduración, las DC disminuyen la expresión de los receptores de quimiocinas CCR1 y CCR5, y aumentan la de CCR7. El ligando de este último se encuentra en las paredes de los ganglios linfáticos y en la zona paracortical ganglionar. En la Figura 23 se muestra de manera resumida el proceso de maduración de las DC. (Serrano, 2007 y Vázquez, 2011).



**Figura 23. Diferenciación de DC.** Las células dendríticas se diferencian a partir de progenitores de médula ósea que llegan a los tejidos a través del sistema circulatorio, y donde residen como DCi hasta que reciben señales que promueven su migración y maduración. Las DCm migran a los ganglios linfáticos, donde activan y polarizan a los linfocitos T in expertos hacia los diferentes tipos de células Th (Vázquez, 2011).

### 5.3. Características fenotípicas de las DC.

Las DC maduras presentan una morfología propia, caracterizada por la presencia de numerosos procesos membranosos que pueden tomar la forma de dendritas, pseudópodos o velos. Contienen altas concentraciones de estructuras intracelulares relacionadas con el procesamiento antigénico, como endosomas, lisosomas o los

gránulos de Birbeck (contienen lectinas tipo C que se unen a manosa y CD1 $\alpha$ , moléculas involucradas en la captación de antígenos) de las células de Langerhans de la epidermis presentes en tejidos y órganos linfoides y no linfoides, así como circulantes en linfa aferente y sangre periférica (Geissmann, 2010a).

Se caracterizan por la elevada expresión de antígenos MHC clase II y la ausencia de marcadores de linaje como CD14 (monocitos), CD3 (LT), CD19, CD20 y CD24 (LB), CD56 (células NK) y CD56b (granulocitos). Presentan moléculas de adhesión comunes con monocitos y macrófagos (CD11a, CD11c, CD50, CD54, CD58, CD102) y moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86). Su fenotipo varía a lo largo de los diferentes estados de maduración y activación. Las DCi pueden expresar CD2, CD4, CD13, CD16, CD32 y CD33, que van perdiendo gradualmente con la maduración. Por el contrario, las moléculas coestimuladoras, de adhesión y los antígenos del MHC aumentan a lo largo de la maduración. Otras moléculas, como CD80 y CD86, incrementan su expresión con la activación, principalmente tras la unión de CD40 a su ligando. CD86 es un marcador temprano de maduración, mientras que CD80 aparece más tardíamente y está ausente en los precursores circulantes (Steinman, 2006 y Serrano, 2007).

#### **5.4. Papel de las DC en la respuesta inmune.**

El sistema inmune tiene diferentes tipos de APC. Todas las células en el organismo tienen la capacidad de expresar MHC-1 y por lo tanto pueden presentar antígenos endógenos como virus o antígenos tumorales a LT citotóxicos CD8<sup>+</sup>. Un grupo más reducido de células dentro de las cuales se encuentran los linfocitos B, monocitos, macrófagos y DC expresan de manera constitutiva MHC-II, lo cual les permite presentar antígenos exógenos a los LT inexpertos, como antígenos obtenidos mediante el proceso de fagocitosis, endocitosis inespecífica o por unión a receptores específicos, por ejemplo, anticuerpos de membrana. Como se había mencionado en capítulos anteriores se había mencionado, a este grupo de células se le denomina APC, sin embargo, las DC se les considera como profesionales, ya que son las únicas capaces de estimular LT inexpertos que no han tenido contacto previo con antígenos (LT inexpertas). Esta capacidad de las DC fue evidente en los estudios realizados con la

reacción mixta de leucocitos (LMR), donde se encontró que las MHC-II son las principales moléculas estimuladoras de LT (Velázquez, 2011).

La activación eficaz de los LT por parte de las DC necesita de varias señales consecutivas. Como ya se mencionó, las DC pueden activar tanto a LT CD4<sup>+</sup> como LT CD8<sup>+</sup> por presentación antigénica vía MHC-II y MHC-I, respectivamente, lo que constituiría la primera señal. La segunda señal se realiza por la interacción con moléculas coestimuladoras presentes en las DCm: CD80 y CD86 con el receptor linfocitario CD28. Si falla esta coestimulación, los linfocitos T se vuelven tolerogénicos. Tras su activación, los LT inexpertos sufren una expansión clonal y una diferenciación a células efectoras secretoras de citocinas y células memoria (Matus, 2009).

El tipo de respuesta consiguiente de los LT depende de varios factores, como la concentración antigénica en la DC, la afinidad del TCR por el MHC, la duración de la interacción de la DC con el LT, el estado de maduración de la DC, y el tipo de estímulo responsable de la maduración de la DC. La supervivencia a largo plazo de los LT y su diferenciación a células de memoria y efectoras requiere la interacción con DC maduras. La activación inducida por DC inmaduras es de más corta duración (Matus, 2009).

#### **5.4.1. Tolerancia.**

Las DC están implicadas en la inducción de tolerancia de LT, ya sea por muerte, anergia o generación de T<sub>reg</sub>. En el timo, las DC participan en la selección negativa de los LT. En periferia la inducción de tolerancia es importante para la eliminación de clones de LT autorreactivos que han escapado de la selección negativa del timo. Este proceso es llevado a cabo por DC que se encuentran en un estado “parcialmente maduro”. De esta manera, se ha evidenciado *in vivo* que las LC que migran a ganglios linfáticos en condiciones de reposo, presentan niveles elevados de MHC-II en superficie y bajos niveles de moléculas coestimuladoras, lo cual las hace buenas candidatas para inducir tolerancia (Casares, 2000).

Por otra parte, las DC, principalmente las  $CD8\alpha^+$  de bazo, están encargadas de la captura de células muertas. Las células propias que han sufrido apoptosis son una constante fuente de antígeno para las DC en condiciones de reposo, por lo cual es necesario generar tolerancia hacia estos antígenos. Uno de los mecanismos consiste en que únicamente se induce una alta expresión de MHC-II cuando las DC, además de capturar células apoptóticas, captan microorganismos, o cuando son estimuladas con LPS al mismo tiempo. Esto indica que los TLR de las DC conducen a la célula a completar su proceso de maduración, lo cual les permitirá generar activación de LT; por el contrario, la ausencia de señal a través de estos receptores indica a la DC que la presentación antigénica debe dirigir a los LT a un fenotipo tolerante (Belmonte, 2007).

Hay evidencias que indican que las DC plasmocitoides tienen un papel relevante en la inducción de tolerancia. Estas células recién aisladas tienen poca capacidad endocítica en comparación con las DCm y expresan bajos niveles tanto de MHC-II como de moléculas coestimuladoras en su superficie. Sin embargo, al ser activadas in vitro con CpG, son capaces de inducir respuesta TH1 en linfocitos T vírgenes; no obstante, son menos eficientes que las DCm. Por otra parte, LT  $CD4^+$  estimulados con IL10 e IFN- $\alpha$ , citocinas altamente producidas por las DC plasmocitoides, adquieren un fenotipo regulador que median sus funciones vía IL-10 y TGF $\beta$ . Estas células son capaces de suprimir la proliferación de otros linfocitos frente a antígenos alógenos. Además, las DC plasmocitoides aisladas de bazo inducen un estado no anérgico en los LT que ni se polarizan ni proliferan, a pesar de la adición exógena de IL-2 en un modelo TCR transgénico. De manera importante, estos LT son capaces de inhibir la proliferación de LT específicos para antígeno (Rivas, 2009).

Se ha observado que el CTLA-4 (antígeno de LT CD8), expresado constitutivamente en los LT, se une a CD80/CD86 en las DC e induce la expresión de IFN- $\gamma$ , el cual de manera autocrina estimula la producción deIDO (indolamina 2,3 dioxigenasa) conduciendo a la generación de metabolitos tóxicos que afectan negativamente la proliferación y supervivencia de los LT. De manera similar, cuando las DC plasmocitoides reciben señales a través de CD200R, receptor para CD200 (OX-2)

pueden producir IDO en un mecanismo dependiente de la estimulación autocrina con IFN- $\alpha$ . Así, las DC plasmocitoides son capaces de inducir tolerancia probablemente a través de tres mecanismos: generación de T<sub>reg</sub>, anergia y delección (González, 2008).

### **5.5. Implicaciones terapéuticas.**

La elevada capacidad de activar LT inexperienceos y LT citotóxicos por medio de la “presentación cruzada” ha hecho que las células dendríticas sean blanco de estudios para crear nuevas técnicas de inmunoterapia contra el cáncer. Los tumores pueden promover, entre otros aspectos, la secreción de TGF- $\beta$  por parte de DC, lo cual induce la proliferación de T<sub>reg</sub> (González, 2008). Sumado a esto, varios estudios demuestran que en tumores, además de encontrar un ambiente inmunosupresor caracterizado por la presencia de factores como IL-10 y TGF- $\beta$ , la falta de moléculas coestimuladoras en DC asociadas a cáncer afecta negativamente la respuesta inmune celular contra el tumor; sin embargo, estas DC infiltradas en tumores sí son capaces de madurar *ex vivo* (Rivas, 2009). Así, al cultivar DC provenientes de un melanoma, éstas aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras en superficie, producen IL-12 y son capaces de inducir proliferación de LT, lo cual indica que sus funciones pueden ser restauradas al cambiar de ambiente. Aprovechando la facilidad para generar DC *ex vivo*, dos estrategias para utilizar estas células en inmunoterapia han sido ampliamente estudiadas. La mayoría de los ensayos implican el aislamiento de DC, seguido de la carga con antígenos tumorales y la posterior infusión de estas DC portadoras de antígenos en el paciente (Eubank, 2011).

La primera implica utilizar DC como adyuvantes de respuesta antitumoral, obteniendo resultados positivos tanto en modelos animales como en pacientes, contemplando factores como: el estado de maduración, si deben ir o no cargadas con péptido y el origen de este mismo, son objeto de constante estudio (Eubank, 2011). La administración de DC cargadas con antígenos autólogos del tumor es un protocolo que ha tenido éxito y ha sido aceptado para inmunoterapia en algunos pacientes; sin embargo, debido a que este método requiere la obtención personalizada de vacunas,

es necesario buscar nuevas estrategias para la obtención de estas células. Varios estudios se han enfocado a la comparación de fuentes antigénicas para cargar DC, demostrando, por ejemplo, que no existen diferencias en la activación de los LT inducida por DC cargadas con RNA proveniente de cáncer renal de donadores, comparado con RNA de una línea celular de este carcinoma. Así mismo, utilizando células muertas de una línea celular de cáncer de colon de rata se demostró que no hay diferencias en la proliferación de los LT cuando son activados con DC cargadas con células que han sufrido apoptosis, necrosis o muerte inducida por formación de sincitios (Matus, 2009).

La segunda opción consta de inducir la maduración de DC directamente en el tumor es una estrategia relativamente nueva que puede ser viable y menos dispendiosa que la generación de estas células *ex vivo*. Sumado a esto, acoplar antígenos a moléculas dirigidas exclusivamente a las DC asegura y maximiza la captura y presentación de estos antígenos. Por ejemplo, antígenos acoplados a anticuerpos contra DC-SIGN son internalizados eficientemente por las DC e inducen una buena respuesta de LT. De la misma manera, inyectar ratones con antígenos acoplados a anticuerpos contra DEC205 (proteína de superficie de DC) junto con un anticuerpo agonista para CD40, promueve la proliferación tanto de LT CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, induciéndose además un fenotipo de memoria (Matus, 2009 y González, 2008).

Se han descrito un elevado número de antígenos tumorales susceptibles de ser utilizados en protocolos de inmunoterapia. Los más significativos se resumen en la Tabla 9 (González, 2008).

El uso de DC en inmunoterapia no se limita a cáncer, por ejemplo, se sabe que una de las características de la “inmunoparálisis” después de sufrir sepsis es que las DC se encuentran alteradas negativamente en cuanto a función y número. De esta manera, en un modelo murino de sepsis, el ratón es susceptible a infecciones por *A. fumigatus* (en condiciones normales es no patogénico) en pulmón en la fase postséptica, y el inyectar DCm derivadas de médula ósea restaura la inmunidad protectora. Restablecer las

funciones y el número de DC en tumores u otro tipo de padecimientos son estrategias que buscan combatir estas enfermedades. El papel de las DC plasmocitoides induciendo tolerancia es prometedor para diezmar el riesgo de rechazo a trasplantes; sin embargo, refinar los conocimientos acerca de los mecanismos que conducen a la tolerancia en lugar de inmunidad, puede brindar mejores herramientas para la utilización de estas células en inmunoterapia (Stokes, 2006 y Matus, 2009).

**Tabla 9. Antígenos tumorales potencialmente utilizables en inmunoterapia con DC.**  
 CEA: antígeno carcinoembrionario; EBV: virus Epstein-Barr; HPV: virus del papiloma humano; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; PAP: fosfatasa ácida prostática; PSA: antígeno prostático específico; TCR: receptor de células T (adaptado de Rivas, 2009).

CLASE DE ANTÍGENO	ANTÍGENO	TIPO DE TUMOR
<b>Antígenos tumor específicos</b>	Idiotipos de inmunoglobulinas TCR Ras (p21) mutado P53 mutado Proteína de fusión ver-abl	Leucemias/linfomas B, melanoma Linfomas T Páncreas, colon, pulmón Colorrectal, pulmón, vejiga, cabeza, cuello LMC, LLA
<b>Proteínas de desarrollo</b>	MART-1/Melan-A MAGE-1/MAGE-3 Familia GAGE Telomerasa	Melanoma Melanoma, colorrectal, pulmón, gástrico Melanoma Varios
<b>Antígenos virales</b>	HPV EBV	Cérvix, pene Linfoma Burkitt, nasofaringe, síndromes linfoproliferativos pos-trasplante
<b>Antígenos específicos de tejido</b>	Tirosina GP100 PAP PSA PSMA Tiroglobulina a-fetoproteína	Melanoma Melanoma Próstata Próstata Próstata Próstata Tiroides Hígado
<b>Antígenos sobre-expresados</b>	Her-2/Neu CEA Muc-1	Mama, pulmón Colorrectal, pulmón, mama Colorrectal, pulmón, páncreas, ovario

# 6

## MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMORES (TAM)



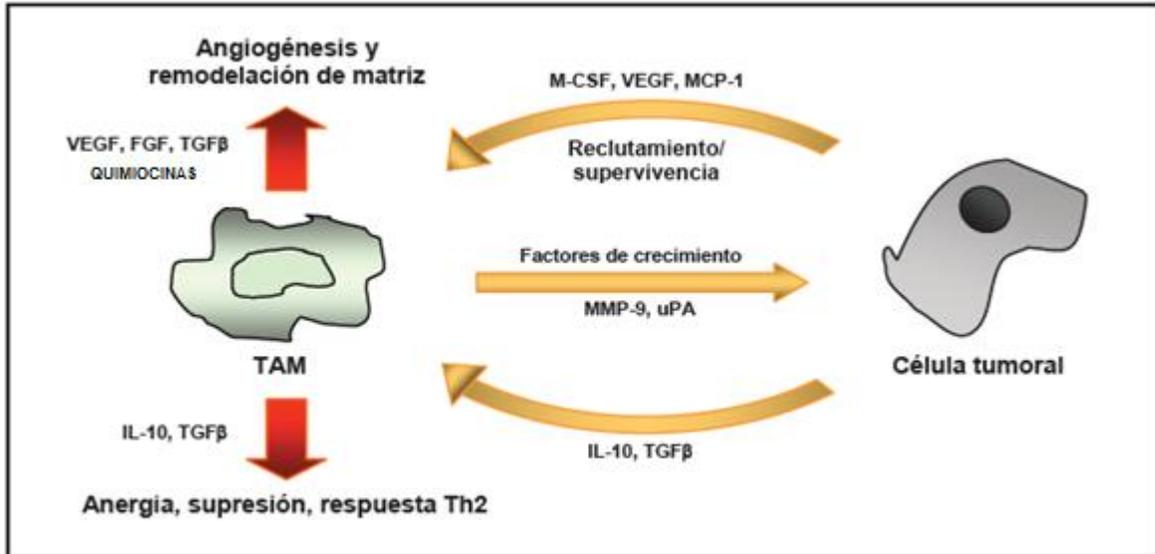
*(Emil Raphael Unanue, 1934)*

## **6.1. Origen de los macrófagos asociados a tumores.**

La masa tumoral es, sin duda, un evento multifacético, donde diferentes tipos de células, incluyendo células neoplásicas, fibroblastos, células endoteliales y macrófagos interactúan entre sí continuamente. Los macrófagos representan hasta el 50 % de la masa tumoral y sin duda, actúan de manera fundamental. Como se había mencionado, los macrófagos representan una población ampliamente heterogénea, identificando en su forma de activación a macrófagos M1 y M2. Actualmente se sabe que los macrófagos asociados a tumores (TAM) son un ejemplo paradigmático de la plasticidad del proceso de activación de macrófagos y de su repercusión fisiológica y patológica. En los tumores existe un gran infiltrado de leucocitos inflamatorios, cuyo estado de maduración y localización espacial determina su influencia sobre el tumor. Los macrófagos son el componente mayoritario de dicho infiltrado tumoral, y constituyen un claro ejemplo de activación alternativa patológica de macrófagos (Vereyken, 2011).

Los TAM se originan a partir de monocitos de sangre periférica reclutados hacia el tumor, en su fase inicial de formación, por factores como M-CSF, MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1), VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular) y Angiopoyetina-2 (Figura 24). La diferenciación intratumoral da lugar a macrófagos con niveles reducidos de receptores de quimiocinas, lo que evita su salida de los tejidos tumorales. Los TAM que se encuentran en el tumor se polarizan hacia el tipo M2, participando en el crecimiento y progresión del tumor. Producen diversas moléculas que colaboran con el mantenimiento de células malignas, modifican las proteínas de la matriz extracelular (ECM) neoplásicas y fomentan el desarrollo de vasos sanguíneos.

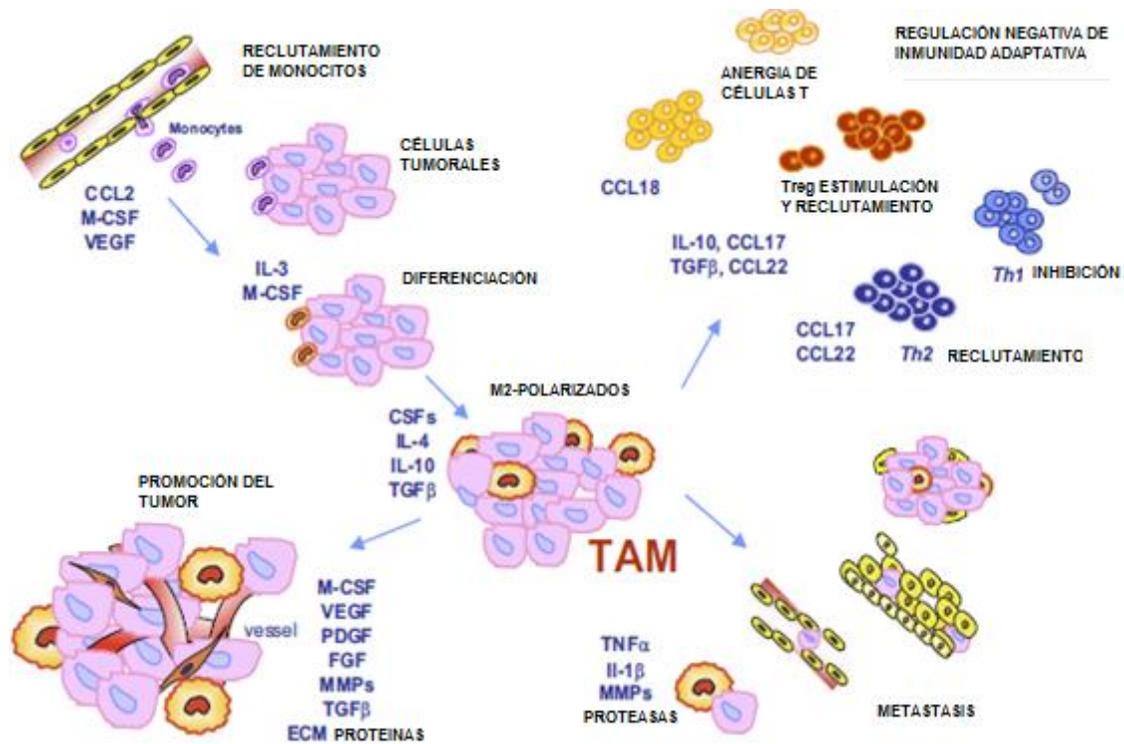
Además los TAM afectan a la respuesta inmune adaptativa mediante el reclutamiento de  $T_{reg}$  y Th2, los cuales inhiben a los Th1 mediante la anergia de LT inexpertos. La elevada densidad de macrófagos en zonas metastásicas, como en los ganglios linfáticos regionales, favorece el crecimiento del tumor (Silva, 2012).



**Figura 24. Interacción entre macrófagos y células tumorales.** Las células tumorales secretan factores que atraen y determinan la polarización de los macrófagos en los tumores. A su vez, los TAM producen factores de crecimiento que promueven angiogénesis y remodelación del tejido, y contribuyen a la progresión y diseminación del tumor (Silva, 2012).

El fenotipo y función de los TAM está determinado por los factores microambientales presentes en el tumor (Figura 25). Las citocinas y factores de crecimiento derivados del tumor (IL-10, TGF- $\beta$ , M-CSF, VEGF, MCP-1) aumentan la generación de macrófagos y reducen la diferenciación de DC y, en consecuencia, determinan los niveles relativos de APC en el tumor y en los tejidos cercanos (Solinas, 2009).

Junto con el TGF- $\beta$ , el M-CSF es responsable del ambiente inmunosupresor intratumoral. De hecho, en un modelo de carcinoma mamario espontáneo, los ratones M-CSF<sup>-/-</sup> presentan una progresión tumoral más lenta que los ratones normales. La IL-10 presente en el tumor induce en los TAM la adquisición de funciones asociadas a macrófagos M2. Por ello, los TAM tienen disminuida su capacidad para producir moléculas anti-tumorales (TNF- $\alpha$ , IL-1, ROS, NO) y citocinas inflamatorias (IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6), y no presentan activación de NF $\kappa$ B (Silva, 2012).



**Figura 25. Reclutamiento de monocitos a la masa tumoral.** Descripción general de TAM. Tienen su origen a partir de monocitos de sangre reclutados en el sitio del tumor por moléculas producidas por células neoplásicas y por las células del estroma. Los principales factores que intervienen en el reclutamiento de monocitos son las quimiocinas CCL2, M-CSF, y VEGF. Cuando los monocitos llegan a la masa tumoral, están rodeados por varias señales microambientales como la IL-3 y M-CSF, capaces de inducir su diferenciación a macrófagos maduros (que ahora se les llama TAM) y dan forma a las "nuevas" células según sea necesario por el tumor (CSF, IL-4, IL-10, y TGF-β). Los TAM trabajan activamente por el tumor: Se producen varias moléculas que sostienen la supervivencia de las células malignas, modificar las proteínas ECM células neoplásicas, promover el desarrollo de una nave de reciente creación, y ayudar a las células tumorales en su progresión. Además, TAM afectan a la respuesta inmune adaptativa significativamente mediante la contratación y estimular células T reguladoras y la contratación de los linfocitos Th2, que a su vez inhiben las células Th1, y mediante la inducción de anergia de células T inexpectos. (Solinas, 2009).

La producción de mediadores inmunosupresores (prostaglandinas, IL-10 y TGF-β) permite a los TAM inducir la diferenciación de T<sub>reg</sub>, que suprimen la actividad de los LT efectores y de otras células inflamatorias, favoreciendo por tanto el crecimiento tumoral. La actividad angiogénica del tumor está asimismo favorecida por la acumulación de TAM en regiones de hipoxia poco vascularizadas, a las que se adaptan por la activación de factores inducibles por la hipoxia (HIF-1 y HIF-2). Los TAM también promueven la angiogénesis a través de la liberación de factores de crecimiento (VEGF, FGF y HGF), metaloproteasas (MMP-9) y activador de plasminógeno (uPA), todos ellos contribuyen a

degradar la matriz extracelular, facilitando por tanto la migración e invasión de células tumorales (Figura 25) (Solinas, 2009).

La expresión de marcadores típicos de macrófagos M2 de ratón como Arg1, Ym1, Fizz1 y lectina 2 de macrófago específica para galactosa N-acetil-galactosamina (Mgl2) se observa en TAM procedentes de fibrosarcoma y de linfoma T BW-Sp3, lo que corrobora el fenotipo alternativo de estos macrófagos; sin embargo, en ese mismo modelo se observan también altos niveles de quimiocinas Th1 como CCL5, CXCL9 y CXCL10, lo que sugiere una desviación de las características típicas de macrófagos M2 (Meléndez, 2010). Aunque los TAM son considerados macrófagos con fenotipo anti-inflamatorio por su secreción de citocinas y la deficiente activación de NFκB, también contribuyen a la angiogénesis y crecimiento tumoral mediante la secreción de mediadores típicos de macrófagos M1 y reguladores de NFκB, como TNF-α, IL-1β y MMP-9 (Gazzaniga, 2007).

Por otro lado, en un estado tumoral avanzado, los TAM de ratón expresan constitutivamente NOS2 y Arg1 que, implicados en el metabolismo de la arginina, favorecen la liberación de NO y aumento en la producción de ROS ( $O_2^-$  y  $H_2O_2$ ) y RNS ( $ONOO^-$ ), deteniendo la proliferación y, eventualmente, provocando la muerte de LT (Solinas, 2009).

En consecuencia, los TAM son capaces de expresar características pro-inflamatorias y supresoras, existiendo un equilibrio en su polarización entre el fenotipo M1 y M2. Esta versatilidad en el fenotipo de los TAM es posiblemente debida al cambio dinámico existente en el microambiente tumoral desde eventos tempranos hasta los estados avanzados del tumor, y está regulada por mecanismos moleculares, como la modulación de la actividad de NFκB o las vías de señalización activadas por hipoxia. En los casos que la presencia de TAM se correlaciona con un buen pronóstico del tumor, el GM-CSF podría ser responsable de la adquisición de un fenotipo citotóxico por los TAM (Eubank, 2011).

## **6.2. Estudios de expresión génica en la diferenciación y activación de macrófagos.**

La identificación de genes diferencialmente expresados en distintas poblaciones de macrófagos activados permite determinar su papel en la adquisición de un fenotipo de polarización concreto, y su posible participación en determinados procesos celulares o fisiológicos. En este sentido, estudios realizados en macrófagos peritoneales tratados con IL-4 han permitido identificar marcadores de activación alternativa de macrófagos en ratón, como Ym1 y Arg1. La expresión diferencial de estos genes dependientes de IL-4 se ha corroborado en un modelo de infección con el nematodo *Brugia malayi*. La identificación de genes asociados a los diferentes estados de polarización de macrófagos puede proporcionar nuevos blancos terapéuticos en patologías inflamatorias, autoinmunes y en cáncer (Malvicini, 2010).

Respecto a los estudios realizados en macrófagos humanos polarizados en presencia de citocinas, se han determinado los cambios génicos inducidos en la diferenciación de monocitos CD14<sup>+</sup> en presencia de M-CSF, y las diferencias existentes entre macrófagos polarizados por LPS e IFN- $\gamma$  o IL-4 (Vereyken, 2011).

También, se han identificado genes cuya expresión se modifica en monocitos expuestos a GM-CSF o GM-CSF e IL-4, o a estímulos “alternativos” como IL-13 o IL-10. Por otro lado, se han analizado macrófagos de ratón generados en presencia de GM-CSF (M1) o M-CSF (M2), y han evidenciado la contribución de IFN- $\gamma$  en las diferencias fenotípicas de ambas poblaciones. La expresión diferencial de citocinas y quimiocinas en respuesta a LPS se justifica porque la señalización desde TLR4 se lleva a cabo de forma distinta en ambos tipos de macrófagos, por la vía independiente MyD88 (caso de los M2) o MyD88-dependiente (para los M1) (Silva, 2012).

Estos estudios de expresión génica han permitido identificar marcadores moleculares asociados a respuestas inmunitarias frente a infecciones bacterianas, patologías como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y el desarrollo de tumores. Por otro lado, estudios realizados sobre la interacción macrófago-patógeno han identificado

estrategias de defensa del hospedero y de evasión por parte del patógeno. En consecuencia, todas estas aproximaciones han hecho posible diseccionar la polarización de macrófagos frente a estímulos patogénicos concretos, lo que ha permitido establecer que los procesos de activación/polarización de macrófagos y de maduración de MDDC son específicos del estímulo que los provoca (Shechter, 2009).

### **6.3. La expresión del Receptor de Folato $\beta$ asociados a TAM constituye un marcador de macrófagos anti-inflamatorios/reguladores M2.**

La activación de macrófagos comprende un amplio espectro de estados funcionales dependientes del microambiente de citocinas. Como ya se mencionó, los macrófagos activados se han agrupado funcionalmente según su respuesta a estímulos pro-Th1/pro-inflamatorios (LPS, IFN- $\gamma$ , GM-CSF) (M1) o pro-Th2/anti-inflamatorios (IL-4, IL-10, M-CSF) (M2). Se ha demostrado que el receptor de folato  $\beta$  (FR- $\beta$ ), codificado por el gene *FOLR2*, es un marcador de macrófagos generados en presencia de M-CSF (M2), pero no de GM-CSF (M1), y que su expresión se correlaciona con un aumento de la captación de folato (Eubank, 2011).

La capacidad de captar folato por los macrófagos es promovida por M-CSF, mantenida por IL-4, prevenida por GM-CSF y reducida por IFN- $\gamma$ , lo que indica una relación entre la expresión del FR- $\beta$  y la polarización M2. De acuerdo con datos *in vitro*, la expresión del FR- $\beta$  se detecta en macrófagos asociados a tumores (TAM), que exhiben un perfil funcional de tipo M2 y ejercen potentes funciones inmunosupresoras dentro del ambiente tumoral. El FR- $\beta$  se expresa y medía la captación de folato por TAM CD163<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>, y su expresión es inducida de una manera dependiente de M-CSF por líquido ascítico tumoral y por el medio condicionado de fibroblastos y líneas tumorales. Estos resultados definen al FR $\beta$  como un marcador de la polarización M2 de macrófagos, e indican que los conjugados de folato con drogas terapéuticas son una potente herramienta en inmunoterapia frente a los TAM (Vereyken, 2011 y Solinas 2009).

#### **6.4. La Activina A previene la adquisición de marcadores anti-inflamatorios/M2 y direcciona la producción de citocinas por los macrófagos.**

La progresión tumoral está favorecida por el cambio en la polarización de los TAM hacia la adquisición de funciones efectoras inmunoreguladoras y antiinflamatorias (macrófagos M2 que expresan FR $\beta$ ). En la actualidad se han buscado factores que controlan la expresión del FR $\beta$  en macrófagos. En este sentido, han identificado a la activina A como una citocina producida por los macrófagos M1 (GM-CSF), y cuya presencia limita la adquisición de la expresión del FR $\beta$  y otros marcadores M2 (M-CSF). De hecho, el GM-CSF promueve la expresión de activina A, mientras que es inhibida por MCSF incluso en macrófagos M1 (GM-CSF). La activina A secretada por los macrófagos M1 (GM-CSF) realiza la actividad de los promotores génicos dependientes de Smad, explicando así la activación diferencial de Smad2 en los macrófagos M1 (GM-CSF) y M2 (M-CSF), lo que contribuye a la inhibición del crecimiento de células tumorales por el medio condicionado de macrófagos M1 (GMCSF) (González, 2010). Recordemos que los factores de transcripción Smad son las proteínas principales transductoras de las vías de señalización TGF- $\beta$  y BMP (proteína morfogénica de hueso). Las TGF- $\beta$  y BMP transmiten información hasta la proteína Smad para que esta frene la división celular y controle que el crecimiento de los tejidos sea ordenado y coordinado (Malvicini, 2010). Además, la activina A modula la producción de citocinas por los macrófagos M2, ya que reduce la producción de IL-10, aunque no modifica la secreción de TNF- $\alpha$ , en respuesta a LPS. Por lo tanto, la activina A direcciona la polarización del macrófago contribuyendo a la generación de macrófagos inflamatorios en respuesta a GM-CSF y limitando la generación de macrófagos anti-inflamatorios y anti-tumorales, lo cual, *in vivo* podría contribuir a generar una respuesta inmune frente a células cancerosas. Como concepto emergente de este análisis postulamos la necesidad de considerar a futuro la incorporación de estrategias que controlen la actividad de factores y/o células con actividad inmunosupresora junto con las herramientas terapéuticas antitumorales tradicionales. (González y Meléndez, 2010).

# 7

## SFM EN LA ATEROESCLEROSIS



*(Rudolf Ludwig Karl Virchow, 1821-1902)*

### **7.1. El monocito/macrófago como blanco terapéutico en la aterosclerosis.**

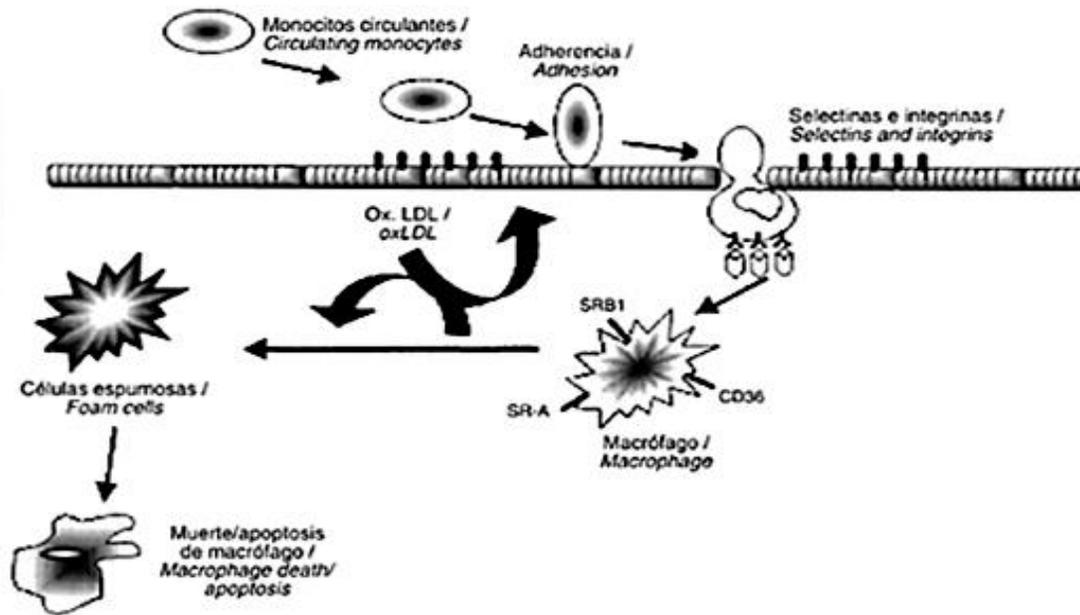
La aterosclerosis es un proceso que se caracteriza por la presencia de lesiones asimétricas y focales en la capa íntima arterial (Hirose, 2011). Este proceso suele iniciar por un evento patogénico, generalmente inflamatorio, con la participación de la inmunidad innata y adaptativa, e incluso las moléculas secretadas por las células que lo conforman pueden acelerar la progresión e incluso dirigir los mecanismos de formación de esta patología (Pacheco, 2011).

En los últimos años se ha puesto en evidencia que los monocitos/macrófagos juegan un papel fundamental tanto en la formación de las placas ateromatosas como en sus complicaciones trombóticas. Una de las primeras etapas en el desarrollo de la placa de aterosclerosis es la unión de los monocitos circulantes al endotelio vascular a través de moléculas de adhesión, con la posterior transmigración hacia la capa subíntimal. Este proceso está favorecido por quimiocinas como MCP-1 (Rivas, 2009).

Los monocitos migran a través de la pared endotelial a la íntima, donde se diferencian rápidamente a macrófagos. Este proceso de diferenciación incluye un incremento en la expresión de receptores para las lipoproteínas oxidadas (ox-LDL) (SR-A, CD36, SR-BI). Mediante tales receptores, los macrófagos captan ox-LDL y desechos de células apoptóticas ricas en colesterol. Los macrófagos, cargados con abundantes acúmulos lipídicos se transforman en células espumosas. Se ha observado que la presencia de ox-LDL en el espacio subendotelial induce en las células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión y de mediadores quimiotácticos para monocitos y células T (Pacheco, 2011) (Figura 26).

Otra población celular que se encuentran considerablemente en lesiones ateromatosas, son las DC y LT (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) activas. Utilizando ratones de laboratorio como modelo experimental, se ha demostrado que las DC plasmocitoides contribuyen en los primeros pasos de la formación de lesiones ateroscleróticas en los vasos sanguíneos. La primera evidencia de esta activación fue la demostración de la expresión del HLA-DR en la superficie de células de músculo liso adyacentes a los LT en las lesiones. La expresión

de este HLA es inducido por la secreción de  $\text{INF-}\alpha$ , producto de las células T activadas. La presencia de estas LT activadas en las placas ateroscleróticas sugiere una respuesta inmune local, y se ha sugerido que dicha respuesta se genera por los antígenos de la placa como ox-LDL y HSP, los cuales son reconocidos como PAMP's induciendo así el reclutamiento celular (Barderas, 2004).



**Figura 26. Mecanismo de reclutamiento de monocitos por la pared arterial y su diferenciación a macrófagos.** Los monocitos circulantes se unen a las células endoteliales por moléculas de adhesión que son inducidas en respuesta señales inflamatorias (oxLDL) (Barderas, 2004).

Los cambios en la función endotelial en aterosclerosis tienen un impacto significativo en la adherencia de DC al endotelio. La activación de las células endoteliales promueve la expresión de moléculas de adhesión para DC (CD11/CD18, selectina-P, selectina-E, ICAM-1). Las DC que son reclutadas activan a los LT que ahí se encuentran, trayendo como consecuencia la amplificación de la inflamación a través de la secreción de citocinas por parte de LT, como:  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  y  $\text{TNF-}\beta$ . El  $\text{INF-}\gamma$  no solo colabora con la activación de macrófagos, también desestabiliza la placa aterosclerótica mediante la inhibición de la proliferación de células de músculo liso y disminuye su síntesis. El  $\text{TNF-}\alpha$  también es capaz de provocar este efecto, y sus repercusiones a futuro son aumentar las moléculas de adhesión en células endoteliales. De esta manera es como

se propone que las DC intervienen en la patogénesis de la aterosclerosis. La participación de las DC plasmocitoides recién descubierto en el desarrollo de la aterosclerosis establece un vínculo directo entre este trastorno y de las reacciones autoinmunes, y revela por qué la estimulación de las DC plasmocitoides, que es característico de las enfermedades autoinmunes contribuye a la progresión de la aterosclerosis (Velázquez, 2011).

Por otra parte, se ha descrito que durante este proceso, las células dendríticas liberan CCL17 a modo de molécula de señalización que inhibe un mecanismo de reacción que normalmente limita la actividad del sistema inmune, haciendo que se active un menor número de  $T_{reg}$  en los tejidos inflamados, lo que explica por qué la inflamación transitoria no se desactiva y se vuelve crónica (Hirose, 2011).

Además, se ha observado una forma de prevenir la progresión de la aterosclerosis empleando un anticuerpo contra la quimocina CCL17, abriendo nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad. En la siguiente fase se espera describir la función de los receptores de CCL17 en la membrana plasmática de las  $T_{reg}$  (Hirose, 2011).

### **7.1.1. Células espumosas.**

La célula espumosa derivada del macrófago, ha sido encontrada en la íntima de estrías grasas de niños y adultos. Constituye la evidencia más temprana de acumulación de lípidos en la pared arterial. Una vez que el monocito reside en la íntima arterial, puede capturar lipoproteínas modificadas y acumularlas mediante receptores específicos, llevando a la conversión de estas células en células espumosas. Los mediadores inflamatorios pueden influir en la expresión de estos receptores para lipoproteínas modificadas. Aunque esta área parece relativamente inexplorada, se sabe que el  $IFN-\alpha$ , un producto de los LTh encontrados en la placa aterosclerótica, favorece la expresión de receptores para lipoproteínas en macrófagos humanos. Otra citocina que podría tener esta misma función es el M-CSF, mediante la inducción de formación de macrófagos al sitio de inflamación (Tiang, 2009 y Hirose, 2011).

### **7.1.2. Metabolismo lipídico del macrófago.**

La acumulación de lípidos en la íntima arterial es un fenómeno central en el desarrollo de la aterosclerosis. La modificación de las LDL en la pared arterial como consecuencia de la captura por parte de los macrófagos, es un fenómeno primordial en la formación de la placa aterosclerótica (Togno, 2009).

Mediante dos mecanismos los macrófagos recogen y degradan las lipoproteínas que contienen colesterol: **a)** Fagocitosis de aquellas células o fragmentos de membranas que contienen colesterol. **b)** Endocitosis mediada por receptores de lipoproteínas plasmáticas que se encuentran en solución o en complejos en formas insolubles con otros constituyentes tisulares. Esta endocitosis se da con la formación de pequeñas invaginaciones que contienen los receptores proteicos. Los macrófagos producen los receptores de membrana que se unen específicamente a las LDL, mencionados anteriormente, y las internalizan mediante endocitosis. Luego de la endocitosis, las partículas de LDL se transportan a los lisosomas, donde hidrolasas degradan la apo-B a aminoácidos y fragmentan ésteres del colesterol a colesterol y ácidos grasos. El colesterol se incorpora directamente a la membrana celular o se re-esterifica y almacena dentro de la célula para uso posterior; los ácidos grasos se usan para hacer nuevos fosfolípidos o triglicéridos (Hirose y Pacheco, 2011).

Las LDL nativas no causan acumulación lipídica dentro de los macrófagos, primero éstas deben ser modificadas por diferentes procesos. La modificación oxidativa se presenta en las células endoteliales, las cuales pueden incorporar LDL nativas que pueden ser proteolíticamente modificadas por elastina, plasmina, calicreína o trombina. Las LDL dentro del espacio intimal se exponen a condiciones prooxidantes que las convierten en ox-LDL; en este estado inducen la expresión y secreción de M-CSF y GM-CSF por parte de las células endoteliales. Igualmente, pueden estimular la secreción de quimioatrayentes específicos de monocitos incluyendo el MCP-1. Así, la oxidación de LDL promueve la captura de ox-LDL por parte de macrófagos, lo cual resulta en formación de células espumosas y producción de quimioatrayentes que

contribuyen a la perpetuación y progresión de la lesión. Las ox-LDL también estimulan la producción de TF por parte de macrófagos promoviendo un balance protrombótico en regiones de placa ricas en macrófagos (Togno, 2009).

## **7.2. Control de la adhesión de monocitos como terapia.**

En la actualidad la arteriosclerosis se considera una enfermedad inmunológico-inflamatoria sistémica de la sangre y de los vasos sanguíneos. Los macrófagos, las células endoteliales y las células musculares lisas producen citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 e IL-6. Diversos estudios han demostrado que los niveles plasmáticos elevados de estas citocinas predicen la existencia de futuros episodios cardiovasculares, incluso en sujetos aparentemente sanos (Hirose, 2011). Estas citocinas rompen el equilibrio fisiológico que mantienen las células endoteliales en relación con la producción de óxido nítrico y el número de moléculas de adhesión, generando disfunción celular. Tanto en modelos animales de aterosclerosis como en lesiones ateroscleróticas humanas, las moléculas de adhesión se encuentran sobre-expresadas en relación con el tejido vascular normal. Además, se ha demostrado que los ratones deficientes en selectina-E, selectina-P o ICAM-1 desarrollan menos arteriosclerosis que los ratones en estado normal (Rivas, 2009).

También en humanos, tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedad coronaria previa, se observó que un aumento en los valores plasmáticos de selectina-E, ICAM-1 o VCAM-1 predecía la posibilidad de presentar un episodio cardiovascular. Se ha demostrado que ratones deficientes en MCP-1, o en su receptor, poseen un menor número de monocitos infiltrados, a la vez que una disminución en el desarrollo de la lesión ateromatosa. En pacientes con síndrome coronario agudo las concentraciones plasmáticas de MCP-1 se han asociado con diferentes factores de riesgo cardiovascular, así como con un mayor riesgo de padecer episodios cardiovasculares futuros. Por lo tanto, el desarrollo de técnicas que ayuden a controlar la expresión de moléculas de adhesión, así como de citocinas quimioatrayentes de monocitos al endotelio, puede ser una ventana para la resolución de esta patología (Stokes, 2006).

### **7.3. Relación entre hipercolesterolemia e inflamación. Importancia de mediadores inflamatorios.**

La relación entre hipercolesterolemia e inflamación es bien conocida. La estatinas, los fármacos hipolipemiantes más utilizados, han demostrado su capacidad de inhibir la expresión de proteínas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) y proteínas quimiotácticas (IL-8, RANTES y MCP-1) de fagocitos mononucleares. También se las ha involucrado en la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, relacionado con la expresión de genes proinflamatorios, y en el aumento de la actividad de factores de transcripción que antagonizan la expresión de genes proinflamatorios. Algunas estatinas reducen la adhesión celular y la expresión de integrinas. Incluso algunos estudios, como el JUPITER (Justification for the Use of statins in Primary prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin), apoyan la utilidad de la monitorización de los niveles de inflamación como guía terapéutica en la prevención de episodios cardiovasculares (Tiang, 2009). En consecuencia, las aproximaciones farmacológicas destinadas a inhibir o retrasar el desarrollo de la aterosclerosis han pasado de la simple reducción de las concentraciones plasmáticas de lípidos a la intervención directa en las células de la pared arterial. Desde este punto de vista, la identificación de blancos terapéuticos en monocitos y macrófagos destinadas a reducir la adhesión y el reclutamiento de estas células, o a inhibir la inflamación y la formación de células espumosas, adquiere una especial relevancia. El desarrollo de nuevos fármacos que actúen modulando estos blancos puede llevar, en un futuro que no debería estar muy lejano, a una mejora sustancial en el tratamiento y la prevención de la enfermedad aterosclerótica (Velázquez, 2011).

# 8

# CONCLUSIONES

- 1) Se realizó una revisión de las funciones morfológicas, diferenciación, migración y activación de las células que conforman el SFM, destacando su aplicación en el uso de nuevas terapias en las que están involucradas.
- 2) Los recientes descubrimientos sobre el comportamiento de los TAM y las DC en la progresión y mantenimiento de células cancerígenas desarrollando un ambiente inmunosupresor que favorece el crecimiento de un tumor; representarán una herramienta útil para la inmunoterapia contra el cáncer.
- 3) La creación de nuevas técnicas de diagnóstico y terapéuticas que implican la activación de LT por células del SFM propiciando una respuesta inmunológica anti-tumoral, representan una promesa clara para el manejo de tumores.
- 4) El reducir la adhesión y el reclutamiento de las células del SFM, inhibiendo así el proceso inflamatorio y la formación de células espumosas; mecanismo directamente implicado en la patogénesis de la aterosclerosis, impide la formación de placas ateromatosas contribuyendo en el tratamiento terapéutico de esta enfermedad.

# 9

# GLOSARIO

- **Ateroesclerosis:** es un proceso inflamatorio crónico que afecta a las arterias de diferentes lechos vasculares y que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media con pérdida de la elasticidad. Su lesión básica es la placa de ateroma.
- **Autotolerancia:** tolerancia frente a los antígenos del propio organismo (capacidad del organismo para reconocer autoantígenos y no reaccionar frente a ellos). Si falla la autotolerancia se establece la autoinmunidad.
- **Cancer:** crecimiento anormal y desordenado de las células del cuerpo, causado por alteraciones celulares causada cuando la clave cromosómica genética ha sido alterada, por lo que las células reciben mensajes erróneos.
- **Capa subintimal:** se localiza al inferior de la capa íntima de una arteria y está compuesta por tejido conectivo con escasas células y plexos vasculares.
- **Citocina:** son moléculas de bajo peso molecular constituidas por aminoácidos que tienen como principal función estimular células a través de sus receptores.
- **Diapédesis:** es la filtración o paso de los leucocitos (glóbulos blancos) de la sangre al sitio donde se puede estar presentando una infección ó inflamación.
- **Fagocitosis:** proceso mediante el cual las células capturan microorganismos o partículas y las confinan en una vacuola citoplasmática (fagosoma) para su posterior digestión y destrucción.
- **Fenotipo:** se le denomina a cualquier característica detectable de un organismo (estructural, bioquímica, fisiológica o conductual) determinado por una interacción entre su genotipo y su medio ambiente.
- **Macrófagos Asociados a Tumores:** se originan a partir de monocitos de sangre periférica reclutados hacia el tumor, en su fase inicial de formación, por factores como M-CSF, MCP-1, VEGF y Angiopoyetina-2.
- **Marcador de superficie:** antígenos generados por las células del organismo que se expresan en la membrana plasmática.
- **Ontogenia:** proceso mediante el cual las células del sistema inmunológico se generan a partir de una célula progenitora pluripotencial.
- **Órganos linfoides primarios:** son aquellos en los que se generan (médula ósea) y se lleva a cabo la selección positivo y negativa de linfocitos (timo). En este sitio las células que actúan contra estructuras moleculares propias son eliminadas y sobreviven únicamente las que no lo hacen (tolerancia central).

- **Órganos linfoides secundarios:** Son estructuras especializadas en la recolección de antígenos de distintos compartimentos anatómicos (bazo, ganglios linfáticos, MALT). En ellos se lleva a cabo la activación de los linfocitos maduros, a través de la «*presentación*» o el contacto con el antígeno, lo que da inicio a la respuesta inmune específica, con la consiguiente proliferación clonal y la generación de células de memoria.
- **Placas de Ateroma:** lesión básica compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso células inflamatorias, y pasa por diferentes estadios.
- **Plasticidad Funcional:** se le denomina a las diversas funciones que una célula puede presentar dependiendo al microambiente y a su especialización en diferentes regiones anatómicas.
- **Polarización:** en células del sistema inmune es el proceso mediante el cual se define la caracterización morfológica y funcional de una célula.
- **Quimiotaxis:** es la habilidad de las células para determinar la dirección de su locomoción a lo largo de un gradiente de concentración de sustancias atractantes o repelentes.
- **Sistema Fagocítico Mononuclear:** es un grupo celular conformado por: monocitos circulantes y sus precursores en médula ósea, macrófagos (M1 y M2) y DC (mieloides y plasmocitoides).
- **Sistema Retículo Endotelial:** grupo de células cuya función es la de capturar partículas inertes que circulan por el organismo.
- **Tolerancia Inmunológica:** Incapacidad del sistema inmune para reaccionar frente a un antígeno específico (cuando un antígeno induce tolerancia se le denomina tolerógeno). La tolerancia puede desarrollarse para todos los epítopos de un antígeno o sólo para algunos de ellos.
- **Tumor:** cúmulo de células generadas por el crecimiento anormal en un determinado sitio anatómico.

# 10

## REFERENCIAS

- Aghaallaei, N.; Bajogly, B.; Schwarz, H.; Schorpp, M. y Bohem, T. (2010). Characterization of mononuclear phagocytic cells in medaka fish transgenic for a cxcr3a:gfp reporter. *Max-Planck Institute of Immunobiology* 107(42) 18017-18084. [En línea] <http://www.pnas.org/content/early/2010/09/28/1000467107.full.pdf>, obtenido el 16/octubre/2012.
- Aguin, M. V.; Pereira, R. C. y Cisneros, G. L. (2012). Propiedades migratorias de las células dendríticas y grado de infectividad en infección por *Leishmania (L) mexicana* en el modelo murino de tolerancia. *ENF INF MICROBL* 32(2) 46-54. [En línea] [http://www.amimc.org.mx/revista/2012/32\\_2/propiedades.pdf](http://www.amimc.org.mx/revista/2012/32_2/propiedades.pdf), obtenido el 21/Junio/2013.
- Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C. y Mantovani, A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev in Onco/Hemat* 66(1) 1-9. [En línea] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104084280700162X>, obtenido el 15/marzo/2013.
- Barderas, G. M.; Gallego, D. J.; Duran, M. C.; Lázaro, A.; Hernández, M. S.; Mas, S.; Jiménez, N. J.; Tuñón, J.; López, B. L. y Ejido, J. (2004). Análisis proteómico de monocitos circulantes. Aplicación a pacientes con síndrome coronario agudo. *Investigación cardiovascular* 7(1) 1-18. [En línea] <http://www.mapfre.com/ccm/content/documentos/fundacion/salud/revista-cardio/vol07-n1-art1-analisis-proteomico.pdf>, obtenido el 25/enero/2013.
- Barreno, G. P. (2008). Inflamación. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* 102(1) 91-140. [En línea] <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>, obtenido el 30/septiembre/2012.
- Belmonte, L.; Parodi, C.; Bare, P.; Baston, M.; Bracco, M. M. y Ruibal, A. B. (2007). Papel de las células dendríticas en la infección por HIV Y HCV. *Instituto de Investigaciones Hematológicas* 67(1) 63-70. [En línea] <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v67n1/v67n1a13.pdf>, obtenido el 2/diciembre/2012.
- Benavidez, J. (2008). Reparación de Heridas Cutaneas. *Rev Asoc Col Dermatol* 16(1) 29-35.
- Campal F., Espinosa G. y Carrasco M. 2004. "Fundamentos y Técnicas de Análisis Hematológicos y Citológicos. Ed. Thompson Paraninfo. Madrid, España. pp: 195-197.
- Capilla, R. M.; Galietero, R. A.; Vilanova, C. M.; Simó, B. M. y Obrer, A. A. (2003). Histiocitosis de Células de Langerhans. A propósito de cuatro casos. *Revista de la Asociación de Neumólogos del Sur* 7(2) 78-81. [En línea] <http://www.neumosur.net/visorfilestop10.asp?nfile=NS1995.07.2.A11.pdf&id=845>, obtenido el 6/enero/2013.
- Carrillo, E. R. (2003). Inmunidad Innata, Receptores Toll y Sepsis. *Cir Ciruj* 71(3) 262-268. [En línea] <http://www.medigraphic.com/pdfs/circir/cc-2003/cc033m.pdf>, obtenido el 1/octubre/2012.
- Cáseres, D. G. (2000). Las células dendríticas: posibles aplicaciones terapéuticas. *Dermatología Venezolana* 36(4) 132-129. [En línea] <http://svdcd.org.ve/revista//1998/36/04/DV-2-1998-Dentriticas.pdf>, obtenido el 29/octubre/2012.
- Castaño, D. y Rojas, M. (2010). Alteraciones en fagocitos mononucleares: un viraje al significado de la muerte de monocitos y macrófagos en la inmunopatogénesis de la

tuberculosis. *Biomédica*. 30(1) 45-64. [En línea] <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/823/953>, obtenido el 15/diciembre/2012.

- Chang, L. Z. (2009). Recent development of the mononuclear phagocyte system: in memory of Metchnikoff and Ehrlich on the 100th Anniversary of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biology of the Cell* 101(12) 709-721. [En línea] <http://www.biolcell.org/boc/101/0709/boc1010709.htm>, obtenido el 4/diciembre/2012.
- Chihara, T.; Suzu, S.; Hassan, R.; Hiyoshi, M.; Kimura, F. y Okada, S. (2010). IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death and Differentiation* 17(5) 1917-1927. [En línea] <http://www.nature.com/cdd/journal/v17/n12/full/cdd201060a.html>, obtenido el 2/febrero/2013.
- Chown, A.; Brown, B. D. y Merad, M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature Reviews Immunology* 11 (5) 788-799. [En línea] <http://www.nature.com/nri/journal/v11/n11/full/nri3087.html>, obtenido el 24/noviembre/2012.
- Correa, D. M. y Rojas, L. M. (2007). Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología* 26(2) 73-86. [En línea] <http://revista.inmunologia.org/Upload/Articles/7/5/759.pdf>, obtenido el 3/febrero/2013.
- Cuellar, Á. A.; Cifuentes, R. C.; Gómez, G. A. y González, E. J. M. (2004). Biología de las células dendríticas humanas. *Universitas Scientiarum*, 9(1) 5-12. [En línea] <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49990101>, obtenido el 5/febrero/2013.
- Dong, C.; Kwas, C. y Wu, L. (2009). Transcriptional Restriction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression in Undifferentiated Primary Monocytes. *J Virol* 83(8) 3518-3527. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663290/>, obtenido el 23/enero/2013.
- Echeverri, D.; Fontanilla, M. y Buitrago, L. (2004). El macrófago en enfermedad vascular ¿El enemigo oculto?. *Rev. Col. Cardiol.* 11(3) 164-173. [En línea] <http://www.scielo.org.co/pdf/rcca/v11n3/v11n3a5.pdf>, obtenido el 13/enero/2013.
- Escobar, S. M. A. y González, M. D. (2010). Linfocitosis hemofagocítica. Informe de un caso de síndrome linfoproliferativo ligado a X. *Patología* 48(4) 256-258. [En línea] <http://www.nietoeditores.com.mx/download/patologia/html>, obtenido el 16/noviembre/2012.
- Esparza, R. y Ávalos, D. E. (2007). El Complemento. *Inmunología* 2(12) 1-13. [En línea] [http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/9701060350/444945/capitulo\\_muestra.pdf](http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/9701060350/444945/capitulo_muestra.pdf), obtenido el 20/febrero/2013.
- Espinoza, R. O. y Paredes, A. P. (2005). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias Segunda parte. *Bioquímica* 29(1) 18-31. [En línea] <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2004/bq041d.pdf>, obtenido el 19/enero/2013.
- Eubank, T. D.; Roda, J. M.; Liu, H.; O'Neil, T. y Marsh, C. (2011). Opposing roles for HIF-1 and HIF-2 in the regulation of angiogenesis by mononuclear phagocytes. *Blood* 117(50) 323-332. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037754/>, obtenido el 18/noviembre/2012.

- Furht, R. V.; Cohn, A. Z.; Hirsch, G. J.; Humphrey, H. J.; Spector, G. W. y Langevoor, L. H. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46(6) 845-852. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2480884/>, obtenido el 11/septiembre/2012.
- Gazzaniga, S. (2007). The role of the inflammatory infiltrate to tumors: two faces of the same coin. *Rev. QuimicaViva* 1(6) 27-41. [En línea] <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v6n1/gazzaniga.pdf>, obtenido el 19/junio/2013.
- Geijtenbeek, T. B.; Engering, A. y Kooyk, Y. (2012). DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *Journal of Leucocyte Biology* 71(2) 921-930.
- Geissmann, F.; Gordon, S.; Hume, D. A.; Mowat, A. M. y Gwendalyn, R. J. (2010b). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 10(6) 453-460. [En línea] <http://www.nature.com/nri/journal/v10/n6/abs/nri2784.html>, obtenido el 11/septiembre/2012.
- Geissmann, F.; Manz, M. G.; Steffen, J.; Sieweke, M. H.; Merad, M.; Ley, K. (2010a). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* 327(5996) 656-661. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2887389/>, obtenido el 12/octubre/2012.
- Ginderachter, V. A.; Movahedi, K.; Van den Bossche, J.; Batseiler, P. (2008). Macrophages, PPARs, and Cancer. *PPAR Research*. Hindawi Publishing Corporation 30(2) 22-33. [En línea] <http://www.hindawi.com/journals/ppar/2008/169414/>, obtenido el 7/enero/2013.
- Goasgen, J. E.; Bennett, J. M.; Bain, B. J.; Vallespi, T.; Bruning, R. y Mufti, G. J. (2009). Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Revista Haematologica* 94 (7) 994-999. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704310/>, obtenido el 5/diciembre/2012.
- González, C. Y.; Castro, G. J.; Vera, C. L.; Támez G. R.; Padilla, R. C. y Morales, R. G. (2008). Las células dendríticas en la inmunopatología de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Mex Patol Clín*, 55(2) 72-78. [En línea] <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2008/pt082d.pdf>, obtenido el 13/noviembre/2012.
- González, P. J., Duque, G. V. y Velásquez, L. M. 2010. FOXP3: controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología* 29(2) 74-84.
- Granados, D. y Delgado, G. (2008). Células Dendríticas (CDs) diferenciadas a partir de Monocitos humanos como herramienta para el estudio de agentes antileishmaniales. *NOVA* 6(10) 163-169. [En línea] [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA10\\_ARTREVIS2\\_DENTRITI.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA10_ARTREVIS2_DENTRITI.pdf), obtenido el 18/septiembre/2012.
- Hansen, G.; Hercus, T. R.; McClure, B. J.; Stomski, F. C.; Dottore, M.; Powell, J.; Ramshaw, H.; Woodcock, J.; Guthridge, M.; Mackinstry, W.; López, A. F. y Parker, M. W. (2008). The Structure of the GM-CSF Receptor Complex Reveals a Distinct Mode of Cytokine Receptor Activation. *Cell* 134(3) 496-507. [En línea] [http://www.cell.com/abstract/S0092-8674\(08\)00813-1](http://www.cell.com/abstract/S0092-8674(08)00813-1), obtenido el 13/noviembre/2012.
- Hartman, M. y Kornfeld, H. (2011). Interactions between Naive and Infected Macrophages Reduce *Mycobacterium tuberculosis* Viability. *Plos one* 6(11) 72-77. [En línea]

<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0027972>, obtenido el 8/febrero/2013.

- Hernández, J. M.; Quesada, R. J. y Melcón, G. S. (2003). Manifestaciones orales de la Histiocitosis de células de Langerhans. A propósito del caso de un niño de dos años. *Revista Médica Oral* 8(2) 19-25. [En línea] <http://www.medicinaoral.com/medoralfree/v8i1/medoralv8i1p19.pdf>, obtenido el 28/octubre/2012.
- Hirose, K.; Iwabuchi, K.; Kiyonagi, T.; Iwahara, C.; Daida, H. y Nakayama, H. (2011). Different responses to oxidized low-density lipoproteins in human polarized macrophages. *Lipids In Health and Disease* 10(1) 2-18. [En línea] <http://www.lipidworld.com/content/10/1/1>, obtenido el 14/febrero/2013.
- Hume, D. A. (2008). Macrophages As APC and the Dendritic cell myth. *The Journal of Immunology* 181(21) 5829- 5835. [En línea] <http://www.jimmunol.org/content/181/9/5829.full>, obtenido el 11/febrero/2013.
- Kaushansky, K.; Lichtman, M. A.; Beutler E.; Kipps T. J.; Seligsohn, U.; Prchal, J. E. (2010). *Williams Hematology*. Octava edición. Ed. Mac Graw-Hill. New York, USA. pp: 1280-1310.
- Kelley, J. M. (2007). Inmunología, Biología Molecular y la Enfermedad. *Revista Méd. Clín. Condes* 18(4) 287-297. [En línea] [http://www.clinicalascondes.cl/Dev\\_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2007/4%20oct/2-Inmunologia-1.pdf](http://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2007/4%20oct/2-Inmunologia-1.pdf), obtenido el 27/septiembre/2012.
- Kunisch, E.; Fuhrmann, R.; Roth, A.; Winter, R.; Lungershausen, W. y Kinne, R. 2006. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis* 63(7) 774-784.
- Laskin, D. L. (2009). Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: A battle of forces. *Chem Res Toxicol* 22(8) 1376-1385. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2787782/>, obtenido el 8/octubre/2012.
- Malvicini, M.; Puchulo, G.; Matar, P. y Mazzolini, G. (2010). Inmunoterapia del cáncer. Importancia del control de la inmunosupresión. *Medicina* 70(2) 565-570. [En línea] <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v70n6/v70n6a16.pdf>, obtenido el 18/junio/2013.
- Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allevana, P.; Vechhi, A. y Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25(12) 677-686. [En línea] <http://www.cell.com/trends/immunology//retrieve/pii/S1471490604002959?returnURL=http://inkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490604002959?showall=true>, obtenido el 11/noviembre/2012.
- Marinovic, M. A. (2008). Inflammation, Issue and repair in reumathyc disease. *Medwave* 1(6) 1-11. [En línea] [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/reumatologia/inflamacion\\_dano\\_y\\_reparacion\\_en\\_enfermedades\\_reumaticas.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/reumatologia/inflamacion_dano_y_reparacion_en_enfermedades_reumaticas.pdf), obtenido el 22/06/2013.
- Matus, M. V. (2009). Células dendríticas y su futuro en oncología. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* 20(11) 129-133. [En línea] <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/588/art3.pdf>, obtenido el 20/septiembre/2012.

- Mayani, H.; Figueroa, F. E.; Pelayo, R.; Montesinos, J. J.; Gúzman, F. P.; González, C. A. (2007). Hematopoyesis. *Centro Médico Nacional Siglo XXI* 2(1) 97-107. [En línea] <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1193426538.pdf>, obtenido el 14/septiembre/2012.
- Meléndez, L. M.; Colon, K.; Rivera, L.; Rodríguez, F. E. y Toro, N. D. (2010). Proteomic analysis of HIV- infected macrophages. *J Neuroimmune Pharmacol* 6(2) 89-106. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3028070/>, obtenido el 14/diciembre/2012.
- Ordoñez, M. D. (2007). Células de Langerhans en la inmunidad cutánea. *Revista de la Asociación Colombiana Dermatológica* 15(4) 280-285. [En línea] <http://www.revistasocolderma.com/numeros/diciembre07/pdfs/Articulo%20de%20revision%20-%20Celulas%20de%20langerhans%20en%20la%20inmunidad.pdf>, obtenido el 28/septiembre/2012.
- Pacheco, M. P.; Ortega, H. A.; Fernández, C. A. y Gómez, G. D. (2011). Ezetimibe inhibe la adhesión y la migración de monocitos a través de la ruta de las proteincinasas activadas extracelularmente (p44/p42ERK1/2). *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 23(4) 160-167. [En línea] <http://www.elsevier.es/es/revistas/clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15/ezetimibe-inhibe-adhesion-migracion-monocitos-traves-ruta-90025559-originales-2011>, obtenido el 7/enero/2013.
- Phillip, W. A.; Koblansky, A. A. y Gosh, A. 2007. Recognition and signaling by toll like receptors. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 22(1) 409-437.
- Pou, J.; Rebollo, A. y Alegret M. (2007). El monocito/macrófago como diana terapéutica para la arterosclerosis. *Clínica de Investigación de Arteriosclerosis. Universidad de Barcelona* 19(2) 92-108. [En línea] [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet?f=10&pident\\_articulo=13101269&pident\\_usuario=0&pcontactid=&pident\\_revista=15&ty=104&accion=L&origen=elsevier&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=15v19n02a13101269pdf001.pdf](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?f=10&pident_articulo=13101269&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=15&ty=104&accion=L&origen=elsevier&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=15v19n02a13101269pdf001.pdf), obtenido el 9/febrero/2013.
- Ramírez, H. G. (2010). Physiology of cutaneous cicatrization. *Revista Facultad de salud.* 2(2) 69-78.
- Rivas, C. A. y Zepeda, G. E. (2009). Características e implicaciones terapéuticas de las células dendríticas. *El Residente* 4(3) 97-104. [En línea] <http://www.medigraphic.com/pdfs/residente/rr-2009/rr093e.pdf>, obtenido el 5/febrero/2013.
- Rojas, D. S.; Pérez, R. J. y Rico, R. G. (2009). Quimiotaxis y Enfermedad. *Rev Méd Inst Mex Seguro Soc* 47(1) 51-56. [En línea] [http://edumed.imss.gob.mx/edumed/rev\\_med/pdf/gru\\_art/A230.pdf](http://edumed.imss.gob.mx/edumed/rev_med/pdf/gru_art/A230.pdf), obtenido el 9/octubre/2012.
- Rojas, R. C.; García, C. B; Parra, D. R.; Solar, A. G.; Oyanedel, R. Q.; Díaz, F. B.; Fortune, J. H. y Etchar, M. K. (2005). Compromiso óseo en histiocitosis de células de langerhans en el niño. estudio radiológico simple. presentacion clinica y diagnostico radiologico. *Rev. Chil Radiol* 11(3) 122-128. [En línea] [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-93082005000300005](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-93082005000300005), obtenida el 21/septiembre/2012.
- Ruiz, J. 2004."Fundamentos de hematología". Tercera edición. Ed. Médica Panamericana. Mexico, D.F. pp: 405-550.

- Sadhu, C.; Ting, J. H.; Lipsky, B.; Hensley, K.; García, M. L.; Simon, S. y Staunton, D. (2007). CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *Journal of Leucocyte Biology* 81(6) 1395-1403.
- Sánchez, M. F. y Martín P. (2011). Avizores del Sistema Inmune, Guardianes del Organismo. Universidad Autónoma de Madrid. Información disponible en línea en: [https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:RcynK\\_04PWqJ:www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1286/1334+&hl=en&gl=mx&pid=bl&srcid=ADGEESgHsC9XMtayYx8FfmkQV314kNHK0BNPscJzpl4rPAmc6Ofr\\_hvHV9XBbBXFEE8oG2jXzZAFXmj7WDf0UwXRgVg2udlOrlVAo2YwJqcWsNYakr1ohKJLqkPflA\\_SZcqpoSlwQd&sig=AHIEtbRRNtUnUrG7AeK9HAVwZ5\\_Jn6fn0A](https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:RcynK_04PWqJ:www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1286/1334+&hl=en&gl=mx&pid=bl&srcid=ADGEESgHsC9XMtayYx8FfmkQV314kNHK0BNPscJzpl4rPAmc6Ofr_hvHV9XBbBXFEE8oG2jXzZAFXmj7WDf0UwXRgVg2udlOrlVAo2YwJqcWsNYakr1ohKJLqkPflA_SZcqpoSlwQd&sig=AHIEtbRRNtUnUrG7AeK9HAVwZ5_Jn6fn0A), obtenido el 17/diciembre/2012.
- Serrano, G. D.; Martínez, N. R.; Sierra, F. E.; Izquierdo, N.; Colmenares, M.; Pla, J.; Rivas, L.; Picado, M. J.; Barbero, J. J.; Lebrero, A. J.; González, S. y Corbi, A. (2007). AM3 modulates dendritic cell pathogen recognition capabilities by targeting DC-SIGN. *Antimicrob Agents Chemother* 51(7) 2313-23. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1913256/>, obtenido el 17/octubre/2012.
- Shechter, R.; London, A.; Varol, C.; Raposo, C.; Cusimano, M.; Yovel, G.; Rolls, A.; Mack, M.; Pluchino, S.; Martino, G. y Jung, S. (2009). Infiltrating Blood-Derived Macrophages Are Vital Cells Playing an Anti-inflammatory Role in Recovery from Spinal Cord Injury in Mice. *Plos Medicine* 6(7) 2-10. [En línea] <http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000113>, obtenido el 2/febrero/2013.
- Sierra, F. E.; Vega, M. A.; Sánchez, M. P.; Corbi, L. A. y Kroguer, A. P. (2010). Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology* 22(3) 130-135. [En línea] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171298510000860>, obtenido el 12/diciembre/2012.
- Silva, T. M.; Neves, C. M. (2012). Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. *Frontiers in Microbial Immunology* 3(134) 1-6. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3389340/pdf/fimmu-03-00174.pdf>, obtenido el 25/diciembre/2012.
- Smith, T.; Bell, C.; Croul, S.; Lewis, M. y Rappaport, J. (2008). Monocyte/macrophage trafficking in acquired immunodeficiency syndrome encephalitis: Lessons from human and nonhuman primate studies. *J Neurovirol* 14(4) 318-326. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2728912/>, obtenido el 27/septiembre/2013.
- Solinas, G.; Germano, G.; Mantovani, A. y Allavena P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leucocyte Biology* 86(5) 1065-1071. [En línea] <http://www.jleukbio.org/content/86/5/1065.abstract>, obtenido el 27/enero/2013.
- Steinman, R. M. (2006). Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells. *Novartis Found Symp* 27(9) 101-109. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17278389>, obtenido el 23/septiembre/2012.
- Steinman, R. M. y Cohn, Z. A. (2003). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 13(7) 1142-62. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2139237/>, obtenido el 7/noviembre/2012.

- Stokes, K. Y. (2006). Microvascular responses to hypercholesterolemia: the interactions between innate and adaptive immune responses. *Antioxid and Redox Signal* 8(3) 1141-51. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910762>, obtenido el 2/febrero/2013.
- Suzu, S.; Harada, H.; Matsumoto, T. y Okada, S. (2005). HIV-1 Nef interferences with M-CSF receptor signaling through Hck activation and inhibits M-CSF bioactivities. *Journal of the American Society of Hematology* 106(8) 3230-3237. [En línea] <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/105/8/3230.long>, obtenido el 5/diciembre/2012.
- Swiecki, M.; Wang, Y.; Vermi, W.; Gilfillan, S.; Schrieber, R. y Colonna, M. (2011). Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *JEM* 208(12) 2367-2374. [En línea] <http://jem.rupress.org/content/208/12/2367.full.pdf+html>, obtenido el 20/Junio/2013.
- Tian, L.; Luo, N.; Klein, R. L.; Chung, H. B.; Garvey, T. W. y Fu, Y. (2009). Adiponectin Reduces Lipid Accumulation in Macrophage Foam Cells. *Atherosclerosis* 202(1) 152-161. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2630479/>, obtenido el 8/septiembre/2012.
- Togno, P. C. y Montor, M. J. (2009). Esteroides sexuales e inmunidad:papel del estradiol sobre las células dendríticas. *Rincón del Residente* 61(6) 521-532. [En línea] <http://www.artemisaenlinea.org.mx/acervo/pdf>, obtenido el 7/febrero/2013.
- Toro, M. A.; Restrepo, R. y Ochoa, A. (2009). Histiocitosis de células de Langerhans. *Rev Asoc Col Dermatol* 17(2) 34-44. [En línea] <http://www.revistasocolderma.com/numeros/marzo09/pdfs/Articulo%20de%20revisión%20-%20Histiocitosis%20de%20celulas%20de%20Langerhans.pdf>, obtenido el 11/octubre/2012.
- Van Hemer, F. J.; Voermans, C.; Van Eck- Smith B. L. F. y Bennink, R. J. (2009). Labeling monocytes for imaging chronic inflammation. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 53(3) 78-88. [En línea] [http://www.researchgate.net/publication/23964577\\_Labeling\\_monocytes\\_for\\_imaging\\_chronic\\_inflammation](http://www.researchgate.net/publication/23964577_Labeling_monocytes_for_imaging_chronic_inflammation), obtenido el 22/noviembre/2012.
- Vázquez, B. M.; Sureda, M. y Rebollo, J. (2011). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología* 17(2) 1-10. [En línea] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213962611000680>, obtenido el 14/octubre/2012.
- Vega, R. G. (2008). Fagocitosis. *Inmunología para el médico general. Rev Fac Med UNAM* 51(6) 261-263. [En línea] <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un086i.pdf>, obtenido el 3/diciembre/2012.
- Velázquez, G. E.; Espinoza, T. M. y Bernabe, R. C. (2011). Síndrome hemofagocítico ¿urgencia dermatológica?. *Dermatología Rev. Méx.* Vol. 55 No. 5. p.p: 306-311. [En línea] <http://www.nietoeditores.com.mxe-hemofagocitico-iurgencia-a-dermatologica.html>, obtenido el 27/diciembre/2012.
- Vereyken, E. J.; Heijnen, D. P.; Baron, W.; Vries, H. E.; Dijkstra, C. y Teunissen, E. C. (2011). Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types. *Journal of Neuroinflammation* 8(58) 58-66. [En línea] <http://www.jneuroinflammation.com/content/8/1/58>, obtenido el 6/febrero/2013.

- Villalta, A. S.; Nguyen, H. X.; Deng, B.; Gotoh, T. y Tidball, J. G. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 18(3) 482-496. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2638796/>, obtenido el 2/enero/2013.
- Volpe, S.; Cameroni, E.; Moepps, B.; Thelen, S.; Apuzzo, T. y Thelen, M. (2012). CCR2 Acts as Scavenger for CCL2 during Monocyte Chemotaxis. *Plos One* 7(5) 371-384.
- Webster, S. J.; Daigneault, M.; Bewley, M. A.; Preston, J. A.; Marriot, H. M.; Walmsley, S. R.; Read, R. D.; Whyte, M. K. y Dockrell, D. H. (2010). Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease. *J Immunol* 185(5) 2968-2979. [En línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2929480/>, obtenido el 3/noviembre/2012.
- Welner, R. S.; Kinkade, P. W. y Pelayo, R. (2007). Linfopoyesis Temprana en médula ósea adulto. *Inmunología* 26(3) 135-144. [En línea] <http://revista.inmunologia.org/Upload/Articles/7/6/766.pdf>, obtenido el 22/enero/2012.
- Wittamer, V.; Bertrand, J. Y.; Gutschow, P. y Traver D. (2011). Caracterizacion of the mononuclear phagocyte system in zebrafish. *Journal of the American Society of Hematology* 117(30) 7126-7135. [En línea] <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/117/26/7126.full.pdf>, obtenido el 21/enero/2013
- Yang, M.; Chen, J.; Su, F.; Yu, B.; Fengxi, S.; Ling, L.; Liu, Y.; Huang, J. y Song, E. (2011). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Molecular cancer* 10(1) 2-13. [En línea] <http://www.molecular-cancer.com/content/10/1/117>, obtenido el 7/septiembre/2012.