



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Efectos del IFN-gamma  
en dos modelos humanos de diferenciación monocito-macrófago.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

NATALIA ADRIANA MARTAGÓN CALDERÓN

TUTOR PRINCIPAL: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

[INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS](#)

[UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ:

DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA [DEPTO. FARMACOBIOLOGÍA, CINVESTAV](#)

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO [INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM](#)

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA [INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM](#)

MÉXICO, D. F., SEPTIEMBRE, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

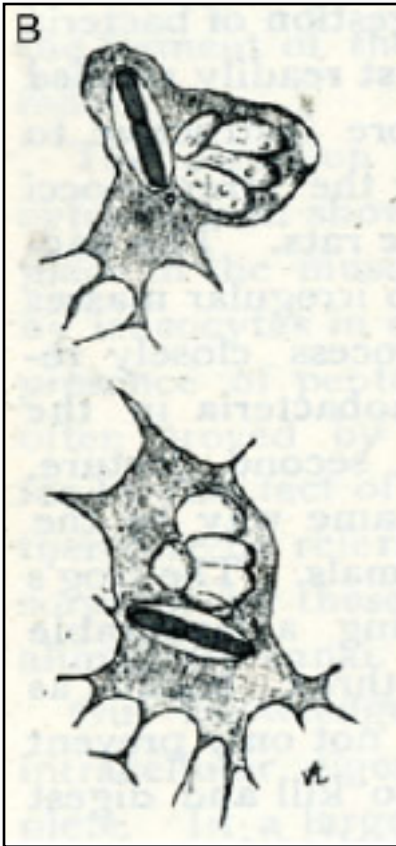


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

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

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

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



Metchnikoff, E., Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation  
Delivered at the Pasteur Institute in 1891, Starling, F. A. and Starling, E. H.  
(transl.), Dover Publications Inc., New York 1968 <sup>40</sup>.

ALL OF OLD. NOTHING ELSE EVER. EVER TRIED. EVER FAILED. NO  
MATTER. TRY AGAIN. FAIL AGAIN. FAIL BETTER.

S. BECKETT



## Tabla de contenido

<b>Resumen</b>	<b>9</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>10</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
IFN $\gamma$ en la respuesta inmune	11
Propiedades del IFN $\gamma$	12
Señalización del IFN $\gamma$	12
Monocitos	15
Macrófagos	17
Activación y plasticidad de monocitos y macrófagos.	18
Filamentos de actina	20
Regulación de la polimerización de actina	21
Papel del citoesqueleto de actina en el proceso fagocítico	23
<b>Antecedentes</b>	<b>25</b>
<b>Objetivo</b>	<b>27</b>
<b>Objetivos Particulares</b>	<b>27</b>
<b>Estrategia Experimental</b>	<b>28</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>30</b>
Cultivo de células	30
Sedimentación diferencial de F-actina y G-actina	30
Western blot	31
Tinción intracelular anti-actina	32
Tinción de F-actina con NBD-falacidina	32
Expresión de marcadores por citometría de flujo.	32
Ensayo de fagocitosis	33
Diferenciación de THP-1 con PMA	33
Citometría de flujo	34
<b>Resultados</b>	<b>35</b>
1 Efecto del IFN $\gamma$ sobre la fagocitosis y polimerización de actina en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (M $\phi$ )	35
2. Estandarización de protocolos para cuantificación de actina	38
2.1 Detección en extractos celulares por Western blot	38
2.1.1 Separación de F y G-actina	38
2.1.2 Modificación de balance F-/G- actina in vitro	41
2.1.3 Cantidad de actina total en células con IFN $\gamma$	43
2.2 Detección de actina total por citometría de flujo	45
3. Establecimiento de modelo en línea celular THP-1	47
3.1 Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos de la línea celular THP-1	47

3.1.1	Expresión de marcadores de membrana	47
3.1.2	Capacidad fagocítica	49
3.1.3	Contenido de F-actina	51
3.2	Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos de la línea celular THP-1 diferenciados con PMA	53
3.2.1	Marcadores de membrana	53
3.2.2	Capacidad fagocítica	55
3.2.3	Contenido de F-actina	57
4.	Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos aislados de sangre periférica	59
4.1	Marcadores de membrana	59
4.2	Capacidad fagocítica	61
4.3	Contenido de F-actina	62
	<b>Discusión</b>	<b>63</b>
	<b>Apéndice</b>	<b>72</b>
	<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>73</b>

## Resumen

La citocina IFN $\gamma$  juega un papel importante en la activación de macrófagos, aumentando la capacidad microbicida de las células mediante la regulación de vías de presentación antigénica y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Se ha reportado un efecto negativo de IFN $\gamma$  sobre la capacidad fagocítica de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana. Dicho efecto se asocia a un aumento de el nivel de activación de la GTPasa Rac1 y un nivel basal mayor de actina filamentosa.

Para poder investigar acerca de los mecanismos por los que IFN $\gamma$  pudiera modificar el citoesqueleto de actina, se buscó establecer una metodología para comparar, tanto el nivel de actina total, como la proporción entre actina filamentosa y actina globular en células monocíticas.

Así mismo, se exploró el efecto de IFN $\gamma$  sobre una línea celular para estudiar en ella los cambios generados en el citoesqueleto. Para esto, se evaluó el efecto sobre monocitos de la línea celular THP-1 y sobre monocitos de la misma línea diferenciados a macrófagos. Se caracterizó, mediante citometría de flujo, un patrón de cambio de marcadores de membrana inducidos por el tratamiento con IFN $\gamma$ , así como el efecto del tratamiento sobre la capacidad fagocítica y contenido de F-actina en las células.

Las condiciones probadas no permitieron una clara separación de fracciones de actina filamentosa y globular por solubilidad a tritón y sedimentación diferencial. Se observó que el nivel de actina total, medida por inmunodetección en Western blot y por citometría de flujo, no cambia en células tratadas con IFN $\gamma$  por 48 horas (30 ng/mL) comparadas con células no tratadas (control).

En las células THP-1 tratadas con IFN $\gamma$  se detecta un nivel de mayor de expresión del receptor de membrana Fc $\gamma$ RI así como la inducción de la molécula de presentación HLA-DR. El IFN $\gamma$  tiene un efecto variable sobre la capacidad de las células para fagocitar glóbulos rojos de carnero. Por otro lado, el contenido de F-actina no se modifica en células tratadas.

Las células THP-1 diferenciadas a macrófagos tienen también una mayor expresión de los marcadores Fc $\gamma$ RI y HLA-DR. En estas células se induce la expresión de CD11b y en aquellas tratadas con IFN $\gamma$ , de la molécula co activadora CD80. La capacidad fagocítica es inhibida bajo el tratamiento con IFN $\gamma$ , pero se observan resultados variables que pudieran deberse a la antigüedad del cultivo. La cantidad de F-actina tampoco varía en este tipo celular tratado con IFN $\gamma$ .

Se evaluó también si el efecto negativo en la capacidad fagocítica de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica depende de su estado de maduración. Al evaluar en cultivos primarios la capacidad fagocítica de monocitos de sangre periférica sin diferenciar se observa una notoria inhibición de la capacidad fagocítica. Respecto a la línea celular, las células THP-1 diferenciadas a macrófagos son el modelo más parecido a lo que se observa en macrófagos derivados de monocitos.

## **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó en el laboratorio a cargo del Dr. Enrique Ortega, en el Depto. de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se llevó a cabo gracias a los apoyos financieros de CONACYT (178803) y DGAPA-UNAM (204012), así como por el programa de becas de posgrados de alta calidad, CONACYT (254094).

## Introducción

### IFN $\gamma$ en la respuesta inmune

El IFN $\gamma$ -gamma (IFN $\gamma$ ) es una citocina con propiedades proinflamatorias, antiproliferativas y apoptóticas, importantes en su conjunto para la defensa del organismo. Originalmente, fue identificada por su actividad antiviral, en la década de los 60's <sup>1</sup> y con el tiempo se han descrito otras funciones que tiene en relación al sistema inmune <sup>2</sup>.

Esta citocina es producida principalmente por células NK y linfocitos T, y modula una gran variedad de respuestas a través del control transcripcional de genes blanco, en su mayoría factores transcripcionales. Mientras que las células NK expresan de manera constitutiva ciertos niveles de RNA mensajero para IFN $\gamma$ , los linfocitos T efectores la producen después de ser activados. Su inducción es estimulada por IL-12 o IL-18, citocinas secretadas por células presentadoras de antígenos (como células dendríticas maduras), que junto con otros estímulos activan a linfocitos T y los polarizan al perfil conocido como Th1, que son los linfocitos T efectores secretores de IFN- $\gamma$ .

El IFN $\gamma$  funciona como puente entre respuestas del sistema inmune innato y adquirido; por un lado, es producido por células NK, de la inmunidad innata, y su producción estimula el inicio de una respuesta adaptativa. Por otro lado, el IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos Th1 (de la inmunidad adquirida) tiene efectos activadores sobre células efectoras de la inmunidad innata, como los macrófagos y monocitos. El IFN- $\gamma$  secretado tiene también efectos sobre el tráfico leucocitario a un sitio de infección, estimulando la producción de quimiocinas atrayentes de células T y monocitos, además de la expresión de moléculas de adhesión que favorecen el reclutamiento de linfocitos.

El papel de IFN $\gamma$  en el establecimiento de respuestas celulares tipo Th1 y el efecto de este tipo celular en la activación de fagocitos profesionales como neutrófilos, células dendríticas, monocitos y macrófagos es un proceso ampliamente estudiado<sup>3</sup>. Estas células de la respuesta inmune innata suelen ser las primeras en interactuar con patógenos que entran en el organismo. Durante infecciones con patógenos intracelulares, las células presentadoras de antígeno migran a órganos linfoides secundarios donde activan células T ayudadoras con fenotipo Th1. Dicho fenotipo es inducido por IL-12 así como por el propio IFN $\gamma$ . Las células Th1, pueden entonces producir altas cantidades de IFN $\gamma$  y otras citocinas, que activan a los fagocitos profesionales aumentando su capacidad para eliminar a los patógenos que internalizaron.

## Propiedades del IFN $\gamma$

A diferencia de la familia de interferones tipo I (INF- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\kappa$ , - $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\tau$ , - $\omega$  y - $\zeta$ ), IFN $\gamma$  es el único IFN $\gamma$  conocido de tipo II, definido tanto por sus características fisicoquímicas, como por su secuencia y estructura. La molécula de IFN $\gamma$ , codificada por un solo gen, consiste en dos cadenas polipeptídicas iguales de 166 aminoácidos de longitud, que se asocian de forma simétrica y anti-paralela. El homodímero es la forma activa que se puede unir a su receptor <sup>45</sup>.

La función de IFN $\gamma$  se ha estudiado principalmente en humanos y modelos murinos, aunque se conoce un gen que lo codifica no sólo en mamíferos, sino en algunas especies de aves, peces y en la rana. De acuerdo al estudio de Savan, el surgimiento de este gen se puede localizar hace 450 millones de años, como una posible duplicación y diversificación a partir del locus de la familia de citocinas tipo IL-10 <sup>6</sup>.

## Señalización del IFN $\gamma$

Respecto a sus efectos funcionales, el IFN $\gamma$  modula la expresión de moléculas clave en las vías de presentación de péptidos antigénicos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II, lo que supone un aumento en la cantidad y diversidad de péptidos presentados a células T tanto citotóxicas como cooperadoras (helper), y por tanto su activación específica <sup>7</sup>.

Los macrófagos atacan a bacterias, protozoarios, virus o células tumorales mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno dentro del fagosoma. Dichas especies son generadas por el sistema la NADPH oxidasa y la enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS), respectivamente. La mayor fuente de especies reactivas de oxígeno en macrófagos se produce gracias a NADPH oxidasa (también conocida como phox). Dentro de los efectos desencadenados por IFN $\gamma$  en macrófagos y que contribuyen a la función efectora de éstas células se encuentran: la producción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la formación de sustratos y cofactores del estallido respiratorio y la sobre-expresión de subunidades necesarias para el complejo de formación de especies reactivas de oxígeno. Además, la activación de macrófagos con IFN $\gamma$  induce la sobre expresión del receptor tipo I para inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ RI), del receptor para complemento CR3, y la síntesis de los factores C2 y C4 del sistema de complemento, lo que potencia otros mecanismos microbicidas en fases posteriores de la infección.

Otra de las formas en las que IFN $\gamma$  actúa es regulando el tránsito leucocitario, ya que induce la producción de moléculas de adhesión necesarias para la transvasación de leucocitos (ICAM-1, VCAM-1) y quimiocinas como MCP1 y CCL5 <sup>7</sup>.

El mecanismo de transducción de señales del IFN $\gamma$  es uno de los modelos paradigmáticos de la señalización celular, y consiste en un receptor asociado a cinasas de tirosina de la familia JAK (*Janus kinases*) y a la activación de los factores transcripcionales STAT (*signal transducer and activator of transcription*). El receptor de IFN $\gamma$  está compuesto de dos subunidades, IFNRG1 e IFNGR2 y estas subunidades están asociadas a las cinasas tipo JAK1 y JAK2, respectivamente. Es un receptor expresado en varios tipos celulares, pero tiene una alta expresión en monocitos, macrófagos y neutrófilos, así como en linfocitos B y linfocitos T activados.

La señal al interior de la célula ocurre mediante la dimerización de las dos subunidades inducida por la unión del ligando (IFN $\gamma$ ), y la trans-fosforilación recíproca de las cinasas JAK 1 y 2. Las cinasas JAK fosforiladas pueden entonces activar a los factores STAT1/3 que, al ser fosforilados, forman dímeros y se trasladan al núcleo, donde funcionan como factores de transcripción de un gran número de genes<sup>8</sup>. Dentro del núcleo, los dímeros de STAT se unen a secuencias consenso denominadas GAS y junto con ciertos co-factores promueven la transcripción de genes blanco.

La regulación negativa de esta vía ocurre mediante procesos como la internalización del receptor de IFN $\gamma$ , y la activación de fosfatasa y proteínas inhibitorias tipo SOC que limitan la actividad de las cinasas JAK.

Muchas de las funciones efectoras de IFN $\gamma$  suceden por regulación cruzada con las vías de señalización de otras citocinas. Por ejemplo, IFN $\gamma$  inhibe la regulación negativa de otras vías de señalización inducidas por estímulos pro-inflamatorios, como la estimulación a través de TLRs (*Toll Like Receptors*). De esta forma, las células responden de manera más acentuada ante señales como LPS, el producto bacteriano que se une al TLR4.

IFN $\gamma$  también interfiere en la vía de señalización de IL-10, una citocina con actividad anti-inflamatoria. Además, se ha descrito un papel homeostático de IFN $\gamma$ , restringiendo la destrucción de tejido asociada a procesos inflamatorios, ya sea inhibiendo la señal de IL-1 (y la subsecuente producción de factores destructores de tejidos), o la de ciertos TLRs que inducen la liberación de metaloproteasas de la matriz celular<sup>9</sup>.

En relación a la respuesta de IFN $\gamma$  a nivel transcripcional, S. Ehrt ha reportado una alteración del 25% del transcriptoma de macrófagos de ratón luego de la activación por 48 horas con IFN $\gamma$ , en un estudio donde se detectaron alrededor de 400 genes sobre expresados<sup>10</sup> en respuesta al IFN $\gamma$ . El estudio con microarreglos en monocitos humanos de Waddell reporta 294 genes sobre expresados luego de 24 horas con la citocina<sup>11</sup>. Se muestra en la Tabla 1 algunos de esos genes agrupados de acuerdo al proceso celular con el que se les asocia:

Tabla 1. Genes sobre expresados en monocitos humanos luego de 24 hrs de tratamiento con IFN $\gamma$  <sup>11</sup>.

Proceso celular	Productos sobre regulados
Receptores de citocinas/quimiocinas (alrededor de 40 genes)	CCRL2, CRLF1, CSF2RB, HM74, IL15RA, IL2RA, IL6R, IL8RB
Marcadores de activación celular	CD36, CD38, CD69, CD97
Adhesión celular	CD226, EVA1, ICAM1, ITGAL, ITGA4, ITGB7, LGALS3BP, MUC1, SIAT1
Presentación antigénica por MHC clase I y II	TAP1 y 2, TAPBP, MHC2TA, RFX5, HLA-DMA/B, HLA-DNA, HLA-DPB1
Formación de proteasoma	PSMA2, 4, y 5, PSMB8, 9, y 10, PSME1 y 2
Reciclamiento de proteínas por ubiquitinación	UBD, UBE2E2, UBE2L6, UBE3A, USP25, LOC51619
Reguladores de la vía JAK-STAT	STAT1, JAK2, IRF1, CISH, NMI, PTPRC, PTPRO, SOCS1

Como se mencionó anteriormente, la señal de IFN $\gamma$  por la vía JAK-STAT regula genes mediante factores transcripcionales como los IRFs (*Interferon regulatory factors*) IRF1,-2, 8 y 9. En los promotores de genes inducidos por el tratamiento con IFN $\gamma$  se encuentran motivos de unión de factores transcripcionales tales como STAT, IRFs, C/EBP, EGR, HOX, ISRE, MEF.

La importancia del IFN $\gamma$  en el organismo se aprecia en los casos donde su vía de acción se encuentra afectada. En humanos, se conocen casos de pacientes con deficiencias parciales o completas de las cadenas del receptor IFNGR1 o IFNGR2. Los pacientes en esta situación tienen un síndrome de susceptibilidad mendeliana a enfermedades micobacterianas (MSMD) que como el nombre indica, consiste en una predisposición a, y recurrencia de infecciones por micobacterias. Estas incluyen las infecciones por bacterias normalmente inocuas, como *Mycobacterium bovis*, utilizada en la actual vacuna contra tuberculosis. La severidad del síndrome depende de si la deficiencia es total o parcial, y si es parcial, del grado de deficiencia del receptor. Así mismo, se han reportado mutaciones en el gen codificador de STAT1 que alteran parcialmente su función y provocan el mismo síndrome. Al parecer, la resistencia a micobacterias está muy relacionada a la actividad de IFN $\gamma$  y, si bien IFN $\gamma$  está involucrado en la resistencia a otras bacterias, virus o protozoarios, existen más mecanismos pro inflamatorios con una función redundante para la defensa del organismo <sup>12</sup> ante estos microorganismos.



En el modelo murino, los ratones que carecen de IFN $\gamma$  son más susceptibles a infecciones por las micobacterias *M. tuberculosis* y *M. bovis*, a *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* y el protozooario *Cryptosporidium parvum*, entre otros <sup>2,13,14,15</sup>.

Una aplicación clínica directamente relacionada a la función de IFN $\gamma$  ocurre con la enfermedad granulomatosa crónica. Esta es una inmunodeficiencia congénita en la que neutrófilos, monocitos y eosinófilos no producen superóxido o peróxido de hidrógeno dentro de sus fagosomas. Dicho fenómeno se debe a fallas o deficiencias en las subunidades de la NADPH oxidasa. Debido a ello, el complejo necesario para producir el estallido respiratorio antimicrobiano no se ensambla adecuadamente o el complejo no transfiere electrones para generar las especies reactivas de oxígeno. El padecimiento se caracteriza por infecciones recurrentes en hígado, pulmones, piel y nódulos linfáticos. Los pacientes presentan además micro y macro-granulomas que pueden afectar la función de los órganos.

Actualmente, el IFN $\gamma$  se usa en la clínica como tratamiento para pacientes con enfermedad granulomatosa crónica a dosis de 50 $\mu$ g/m<sup>2</sup> superficie corporal <sup>16,17,18,19</sup>. Por otro lado, IFN $\gamma$  ha sido propuesto como una posible terapia para revertir la inmunosupresión y propiedades pro-tumorales que se han descrito para los macrófagos asociados a tumores (TAMs), un tipo de macrófagos al que se ha asociado un rol patogénico respecto a la generación, crecimiento y metástasis de tumores<sup>20</sup>. Hay un estudio, sin embargo, que reporta a IFN $\gamma$  y su señalización como un factor promotor de sobrevivencia de células cancerosas e inmunosupresión del sistema inmune contra tumores <sup>21</sup>. Esto sugiere que el efecto de IFN $\gamma$  en procesos cancerosos depende del tipo y microambiente particular del tumor. Todo esto hace del IFN $\gamma$  una citocina pleiotrópica cuyos efectos en procesos infecciosos, cancerosos e incluso autoinmunes son entendidos sólo parcialmente.

## **Monocitos**

Los monocitos son células del sistema inmune que se generan durante la hematopoyesis en la médula ósea. Forman parte del llamado sistema fagocito-mononuclear, junto con macrófagos y células dendríticas. Proviene del progenitor mieloide y tienen un patrón de marcadores que los distinguen de linajes de células T y células B (son CD3<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>). Aquellos monocitos generados en médula ósea se diferencian, como el resto de células inmunes en adultos, a partir de células madre hematopoyéticas. De ahí, se generan los monocitos a través de progenitores con decreciente capacidad multipotencial,

que son: unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos, unidades formadoras de macrófagos, monoblastos y pro-monocitos<sup>22</sup>.

En humanos, los monocitos en circulación se han subdividido de acuerdo a la expresión de CD14 (un componente del receptor de lipopolisacárido), CD16 (el receptor tipo III para inmunoglobulina G) y receptores de quimiocinas de la siguiente manera<sup>23</sup>:

Tabla 2. Subtipos de macrófagos humanos y sus propiedades Shi, 2011<sup>23</sup>.

Sub tipo	Marcadores	Receptores de quimiocinas	Función
Clásicos	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup>	CCR2 <sup>hi</sup> CX3CR1 <sup>low</sup>	Similares a monocitos murinos LY6C <sup>hi</sup> (arreglos de expresión genica)
Intermedios	CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup>	CCR2 <sup>low</sup> CX3CR1 <sup>hi</sup>	pro- inflamatorios
No-clásicos	CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	CCR2 <sup>low</sup> CX3CR1 <sup>hi</sup>	patrullaje, anti-virales

Los monocitos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> representan el 80-90% de los monocitos en circulación, son más grandes que los CD16<sup>+</sup> y presentan diferentes receptores de quimiocinas. La población CD16<sup>+</sup> aumenta en estados de infección y producen más citocinas pro-inflamatorias, además, por sus receptores de quimiocinas, son la población que migra de la circulación a tejidos donde hay inflamación, por lo que se les ha denominado monocitos pro inflamatorios. En ratones, las poblaciones de monocitos en circulación se han subdividido de acuerdo a la expresión diferencial de los marcadores Ly6C, CX3CR1 y CCR2. La subdivisión de poblaciones se puede considerar especie-específica, pues la frecuencia y función de las mismas puede variar entre poblaciones consideradas equivalentes entre humano y ratón. Los estudios realizados en modelos murinos de infección con diversos agentes patógenos muestran que tanto monocitos como IFN $\gamma$  son necesarios para resistir infecciones por *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* o *Toxoplasma gondii*<sup>24</sup>.

Dado que los monocitos de sangre periférica no se duplican *ex vivo*, se han usado distintas líneas celulares para el estudio de monocitos y macrófagos humanos, provenientes de pacientes con leucemia monocítica humana. Entre ellas se encuentran las líneas THP-1, U937, Monomac-1 y HL-60. En las leucemias monocíticas se encuentran células progenitoras neoplásicas con diversos estados de diferenciación mieloide (se les considera en su mayoría pro-monocitos) y por ello las líneas pueden tener distinto fenotipo y características proliferativas.

Una búsqueda general de literatura muestra que las líneas más utilizadas son HL-60, U937 y THP-1 (con 4603, 2285 y 1775 publicaciones, siendo el año con más publicaciones 1993, 1996 y 2009, respectivamente. Motor de búsqueda: web of science). Se han establecido métodos para diferenciar las células de la línea THP-1 a fenotipos asociados a macrófagos como se menciona más adelante.

En cuanto a la caracterización de cultivos primarios, Ambarus buscó marcadores particulares de distintos tipos de activación de macrófagos. Tratando cultivos con IFN $\gamma$  por 4 días encontró una expresión diferencial de CD80 y CD64, comparada con otros tipos de activación<sup>25</sup>.

## **Macrófagos**

Los macrófagos, son células derivadas de monocitos que después de nacer se encuentran en todos los tejidos. Su frecuencia y nombre varía según el tejido en que residen. Por ejemplo, los macrófagos en cerebro (microglía) o en el hígado (células de Kupfer) pueden constituir del 10-20% de las células mientras que en otros tejidos su número es muy bajo<sup>26</sup>. Son una población particularmente heterogénea, pues las poblaciones identificadas a la fecha pueden diferir en su origen, localización, capacidad proliferativa, capacidad de diferenciación, fenotipo y función, como se aclara a continuación.

Respecto a su origen, aunque la mayoría de los macrófagos son derivados de monocitos, hay pequeñas poblaciones que se originan en el saco vitelino embrionario, independientemente a las células madre hematopoyéticas<sup>27</sup>.

Los macrófagos se denominan también de acuerdo al tejido donde se encuentran; células de Kupfer, microglía, macrófagos peritoneales, alveolares, de pulpa roja en el bazo, de médula ósea, etc.

En ratón se ha acuñado un término más general: macrófagos residentes, a los tipos celulares que por definición residen en los tejidos y realizan funciones homeostáticas, en contraste con los macrófagos infiltrados, que llegan a tejidos en condiciones de inflamación.

Anteriormente, se suponía que todos los macrófagos residentes de tejido estaban diferenciados de manera terminal y no contaban con capacidad de proliferación, siendo renovados por infiltración de monocitos en estados de diferenciación no conocidos. Sin embargo, existen reportes donde se demuestra que macrófagos de tejido pulmonar o microglía tienen la capacidad de auto renovarse de manera local<sup>28</sup>.

Un modelo de estudio común para macrófagos humanos es la línea celular THP-1. Se cuenta con estudios comparativos del fenotipo entre los pro-monocitos THP-1 y células THP-1 diferenciadas a macrófagos, con cultivos primarios de monocitos de sangre periférica y macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica<sup>29</sup>. Recientemente, se ha desarrollado también un panel de 242 anticuerpos de moléculas de superficie para caracterizar el perfil de monocitos THP-1 y macrófagos THP-1 por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia (BD Biosciences<sup>30</sup>). Como resultado de estas comparaciones se han identificado 23 marcadores celulares expresados únicamente en monocitos THP-1 y 20 únicamente en macrófagos THP-1.

El uso de PMA (Forbol 12-miristato 14-acetato) como inductor de diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos es un método ampliamente establecido. Se cree que esta molécula funciona como activador de la proteína cinasa C (PKC), pues su estructura es similar al diacil glicerol, uno de los activadores fisiológicos de esta enzima. Al cultivar la línea THP-1 con PMA, las células adquieren un fenotipo similar a macrófagos, entre otras cosas adquieren una forma de espigas, se vuelven adherentes, se detiene su proliferación, expresan moléculas como CD11b y disminuye la expresión de CD14<sup>31</sup>.

### **Activación y plasticidad de monocitos y macrófagos.**

Se ha intentado clasificar a los macrófagos en base su estado de activación, es decir, al fenotipo y función que adquieren ante estímulos en un tejido y microambiente dado. Con respecto a las funciones inmunes se describieron los macrófagos de “activación clásica” o M1. El fenotipo de activación clásica es inducido por estímulos como IFN $\gamma$ , LPS o ambos. El macrófago activado clásicamente tiene un alto poder microbicida y de procesamiento y presentación antigénica, además de producir citocinas proinflamatorias. Este es el caso descrito en secciones anteriores.

En contraste, se definieron también los macrófagos con “activación alternativa” o M2, que son inducidos por las citocinas secretadas por linfocitos con perfil Th2, como IL-4 o IL-13. Los macrófagos con activación alterna están involucrados en procesos fibróticos, reparación de tejidos e inmunidad humoral, y en general producen un ambiente anti-inflamatorio. Además, el fenotipo M2 se ha subdividido en fenotipos M2a, M2b y M2c de acuerdo a la exposición a IL-4/IL-13, complejos inmunes más ligandos de TLRs y glucocorticoides/IL-10/TGF- $\beta$ , respectivamente<sup>32</sup>. Autores como Mosser han propuesto marcadores característicos de cada tipo de activación<sup>33</sup>. Sin embargo, los fenotipos arriba

mencionados, no incluyen a macrófagos involucrados en otros procesos importantes como el desarrollo de ductos renales, remodelamiento de hueso, metabolismo de lípidos o angiogénesis.

Aunado a este fenómeno de diversidad funcional, los macrófagos muestran plasticidad en su estado de activación. Durante la diferenciación de células como linfocitos, estímulos de citocinas polarizantes transforman de manera estable el fenotipo de los linfocitos, mediante modificaciones en la cromatina. En contraste, en el caso de las macrófagos, los perfiles de expresión génica (y por tanto los perfiles de activación M1, M2a, etc.) muestran considerable plasticidad, y se ha demostrado que pueden cambiar según el tipo, concentración, y tiempo de exposición a los estímulos polarizantes. Esta plasticidad de los estados de activación de los macrófagos sugiere una ventaja o habilidad de adaptación de este tipo celular para responder ante un microambiente cambiante, como en el caso de una infección, donde son necesarios mecanismos pro-inflamatorios, seguido de reguladores y reparadores de tejido para contener la inflamación. Debido a esto, autores como Mosser y Edwards han propuesto que en tejidos los macrófagos pueden encontrarse dentro de un espectro amplio de fenotipos de activación, en lugar de sub poblaciones discretas con fenotipos estables<sup>33</sup>.

La activación y plasticidad de macrófagos es un área de continua investigación, pues el fenotipo de macrófagos ha probado ser de particular importancia en patologías como cáncer de diversos tipos y aterosclerosis<sup>32</sup>.

Una de las características más interesantes del sistema inmune es la habilidad de las células que lo componen de estar en constante flujo a través de la sangre o linfa y su capacidad migratoria entre órganos linfoides, torrente sanguíneo y tejidos. Esto se logra mediante la activación de distintos receptores membranales que dirigen la remodelación del citoesqueleto celular. Además de su papel en la migración celular, la reorganización del citoesqueleto es esencial para distintos procesos de la respuesta inmune ante infecciones. Entre estos procesos están la: formación de la sinapsis inmunológica, polarización celular, adhesión de células al endotelio vascular, migración y extravasación en sitios donde hay una respuesta inflamatoria en respuesta a quimiocinas, formación de fagosomas y destrucción de los microbios fagocitados.

## Filamentos de actina

El citoesqueleto de actina está formado por filamentos formados por la polimerización de monómeros de actina, también llamada actina globular (G-actina), que interactúan con una variedad de proteínas que se unen a ellos y regulan su ensamblaje. Los filamentos (también denominados F-actina) pueden formar estructuras estables o altamente dinámicas y están involucrados en procesos vitales en los que se necesita el mantenimiento o alteración de la morfología celular. En las células animales, la actina forma filamentos en forma de hélice. Los filamentos son parte fundamental de estructuras más complejas; estructuras con forma tipo hoja (lamelipodios, *ruffles*, copas fagocíticas, podosomas) o en forma de dedo (fillipodios, microvilli), por mencionar algunas. La polimerización de actina implica una compleja regulación en distintos niveles jerárquicos y son estos elementos reguladores los que determinan el tipo de estructura que se forma a partir de los filamentos.

La actina es una de las proteínas más abundantes en una célula y tiene una estructura altamente conservada entre eucariontes. En tejidos, existen tres isoformas de actina:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -actina. Mientras que  $\alpha$ -actina se expresa sólo en células musculares,  $\beta$ - y  $\gamma$ -actina tienen un patrón de expresión ubicuo.

En la Figura 1, se esquematiza el proceso de polimerización de un filamento. El monómero de actina (de 42 kDa) sufre ciclos de unión a ATP, que propicia la formación de filamentos, o hidrólisis de ATP, que favorece su despolimerización<sup>34</sup>.

Los filamentos tienen extremos con propiedades estructurales y cinéticas de unión de monómeros distintas. Los extremos positivos o “barbados” son capaces de incorporar rápidamente monómeros de actina, mientras que en los extremos negativos este proceso es aproximadamente diez veces más lento.

Dentro de las células, la fase inicial de formación de filamentos o “nucleación” es energéticamente desfavorable. De manera contraria, una vez formados pequeños oligómeros de actina el proceso de polimerización ocurre de manera espontánea. Por ello, son necesarias enzimas que inicien, detengan o modifiquen el tipo de elongación requerido. Esta regulación se lleva a cabo mediante una serie de mecanismos como los que se describen a continuación (Figura II).

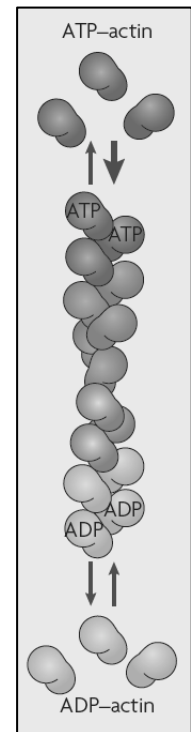


Figura 1. Esquema de polimerización de un filamento de actina. Tomado de Capellone, 2010<sup>34</sup>.

## Regulación de la polimerización de actina

Diversos estímulos extra celulares, como la activación de receptores fagocíticos o de receptores de quimiocinas, son percibidos en la membrana celular y desencadenan señales que resultan en la activación de proteínas G. Las GTPasas involucradas en la remodelación del citoesqueleto de actina son GTPasas de la familia Rho, que incluyen a las enzimas Rho, Cdc42 y Rac. Tanto la forma activa de las GTPasas como el fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) generado, pueden unirse mediante dominios especiales a proteínas de la familia WASP (*Wiskott–Aldrich syndrome protein*) como WASP, SCAR/WAVE, WASH. Estas proteínas se conocen también como factores promotores de nucleación (NFPs), ya que son los promotores directos de los complejos de nucleación.

Actualmente, se conocen los nucleadores Arp2/3, forminas y Spire<sup>35,36</sup>. Los NFPs promueven el acercamiento de los complejos de nucleación a monómeros de actina y se puede así iniciar la formación de un nuevo filamento o la ramificación de uno ya existente.

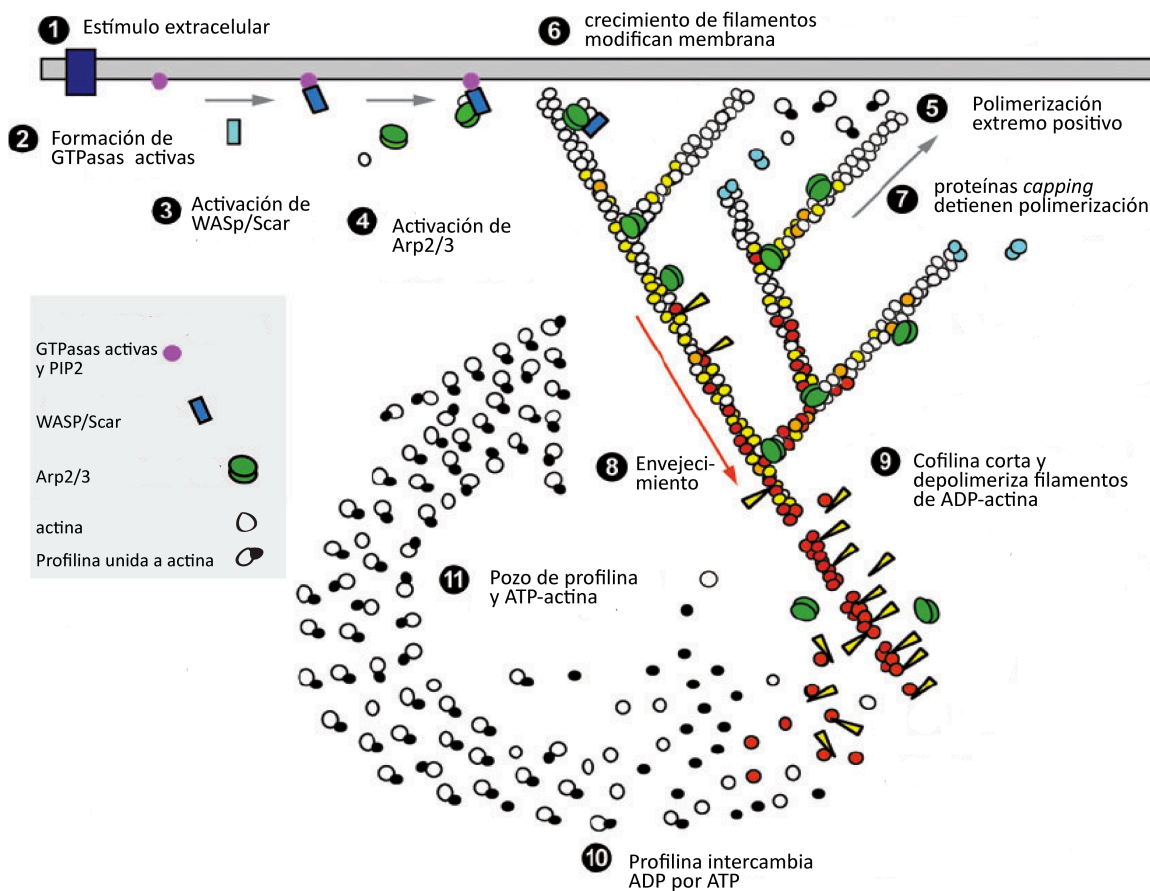


Figura 2. Modelo de regulación de la polimerización de actina. Adaptado de Pollard, 2007<sup>22</sup>.

Finalmente, están también las proteínas de unión directa a actina (*actin binding proteins*, ABPs) que remodelan los filamentos de distintas maneras. Enzimas con actividad de “*capping*”, como gelosina, se unen a los extremos positivos de filamentos y bloquean la adición de monómeros. La enzima cofilina, corta trozos de filamento y favorece la despolimerización a través del intercambio de ATP por ADP en la actina. Por el contrario, la profilina promueve la formación de filamentos intercambiando ADP por ATP.

Un nivel más de complejidad en la transducción de señales hacia la remodelación del citoesqueleto ocurre con la regulación de GTPasas. Como se esquematiza en la Figura III, diversos estímulos extra celulares relacionados a la función inmune inciden en la activación de GTPasas de la familia Rho, a través de los factores intercambiadores de guanina (GEFs) y proteínas activadoras de GTPasas (GAPs). Estas proteínas catalizan el intercambio de GDP o GTP, (GEFs y GAPs, respectivamente), generando así la función de interruptor entre la forma activa e inactiva de las GTPasas. En mamíferos como el ratón existen 23 proteínas de la familia de GTPasas Rho, 79 GEFs y 65 GAPs. Algunas interacciones entre estas proteínas son específicas, mientras que otras son redundantes (en el sentido de que más de un GEF puede interactuar con una GTPasa, etc) y en algunas otras no se ha estudiado aún su función. Una posible razón de la gran diversidad de estos reguladores es la posibilidad de transmitir señales provenientes de múltiples receptores, y su uso como punto de regulación cruzada entre varias vías de señalización<sup>37</sup>.

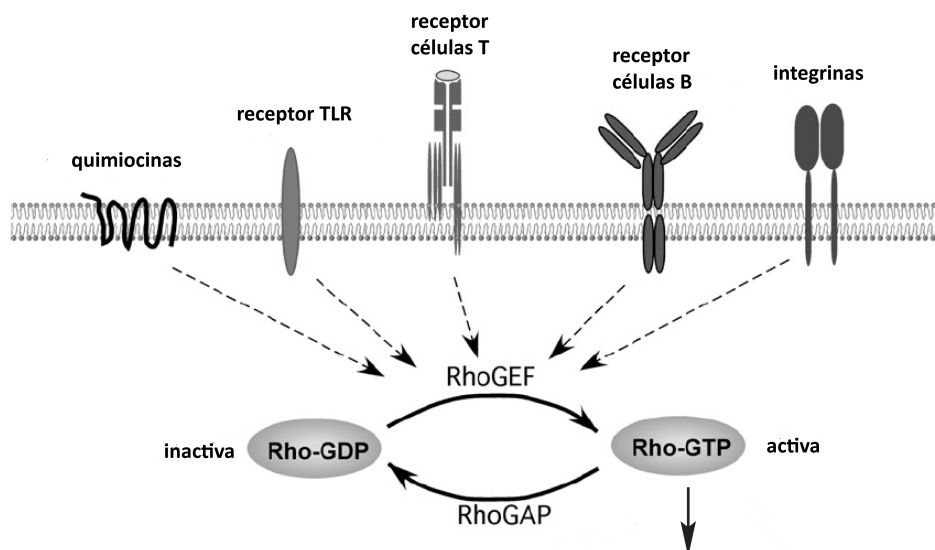


Figura 3. Receptores inmunes y activación de GTPasas Rho. Adaptado de Park, 2010<sup>38</sup>.



La importancia de reguladores del citoesqueleto de actina en células hematopoyéticas se observa en enfermedades humanas en las que este proceso se encuentra alterado, por ejemplo mutaciones en el gen WASP resultan en el síndrome de Wiskott-Aldrich, una severa inmunodeficiencia caracterizada por trombocitopenias, y por infecciones recurrentes debidas a fallas en la migración celular y en la proliferación y sobrevivencia de células inmunes <sup>38</sup>.

## **Papel del citoesqueleto de actina en el proceso fagocítico**

Se le denomina fagocitosis al proceso celular de internalización de partículas mayores a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro<sup>39</sup>. Este fenómeno fue descrito por el microbiólogo ucraniano Elie Metchnikoff (mismo que describió a los macrófagos) desde finales del siglo XIX.

La fagocitosis es un proceso activo, que implica el internamiento de organismos, vivos o muertos, hacia el interior de la célula fagocítica, dentro de una vacuola llamada fagosoma; acidificación del fagosoma y finalmente la digestión y destrucción de la partícula. En contextos fisiológicos las partículas blanco pueden ser bacterias, levaduras, protozoarios, células del hospedero como glóbulos rojos, o restos celulares<sup>40</sup>. En fagocitos profesionales (monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y cebadas), la fagocitosis mediada por receptores para inmunoglobulinas G (FcγRs) y receptores de complemento han sido las más estudiadas.

Durante la fagocitosis mediada por FcγRs, la membrana plasmática se prolonga con estructuras en forma de copa (llamadas copas fagocíticas) sobre las partículas a internalizar. Es una extensión progresiva que ocurre a través de interacciones entre las partículas cubiertas de anticuerpos (opsonizadas) y los receptores para los anticuerpos. Filamentos de actina y miosina se concentran en la copa mientras que se incorporan componentes de membranas intracelulares a la membrana celular (remodelación de la membrana). Para que se cierre la copa fagocítica y la partícula sea completamente cubierta por la célula, se necesita del desplazamiento de actina por polimerización, despolimerización y contracción.

La agregación de receptores en la membrana facilita la fosforilación de los mismos por cinasas de la familia Src. La fosforilación en la región intracelular característica de estos receptores crea sitios de anclaje para la cinasa de tirosinas Syk, que a su vez permite que se unan y activen proteínas adaptadores como GRB2 y GAB2, la cinasa PI3K tipo I o la fosfolipasa PLC $\gamma$ -1. Las proteínas adaptadoras como GRB2 promueven además la activación de GEFs como ARF1 y ARF6 para activar a las GTPasas necesarias. La reorganización de la membrana es coordinada por GTPasas tipo RAC1, que estimulan la polimerización de actina principalmente por activación de WAVE, y éste a Arp2/3<sup>41</sup>.

## Antecedentes

El IFN $\gamma$  es conocido como un factor potenciador de la actividad microbicida de macrófagos. En este sentido, esta citocina se ha referido también como promotora de la capacidad fagocítica<sup>7,42</sup>. Sin embargo, se ha reportado que el tratamiento de fagocitos mononucleares humanos con IFN $\gamma$  induce una reducción en su capacidad fagocítica, tanto de la fagocitosis mediada por receptores para inmunoglobulina IgG (Fc $\gamma$ R) como mediada por otros receptores<sup>43,44,45</sup>.

En nuestro grupo de investigación se estudió el efecto del tratamiento con IFN $\gamma$  sobre las vías de señalización involucradas en el proceso fagocítico mediado por Fc $\gamma$ R<sup>46</sup>. Aunque el tratamiento con IFN $\gamma$  de cultivos de macrófagos humanos derivados de monocitos (M $\phi$ ) modifica la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RI y IIb, no se detectaron cambios en los eventos de señalización tempranos inducidos

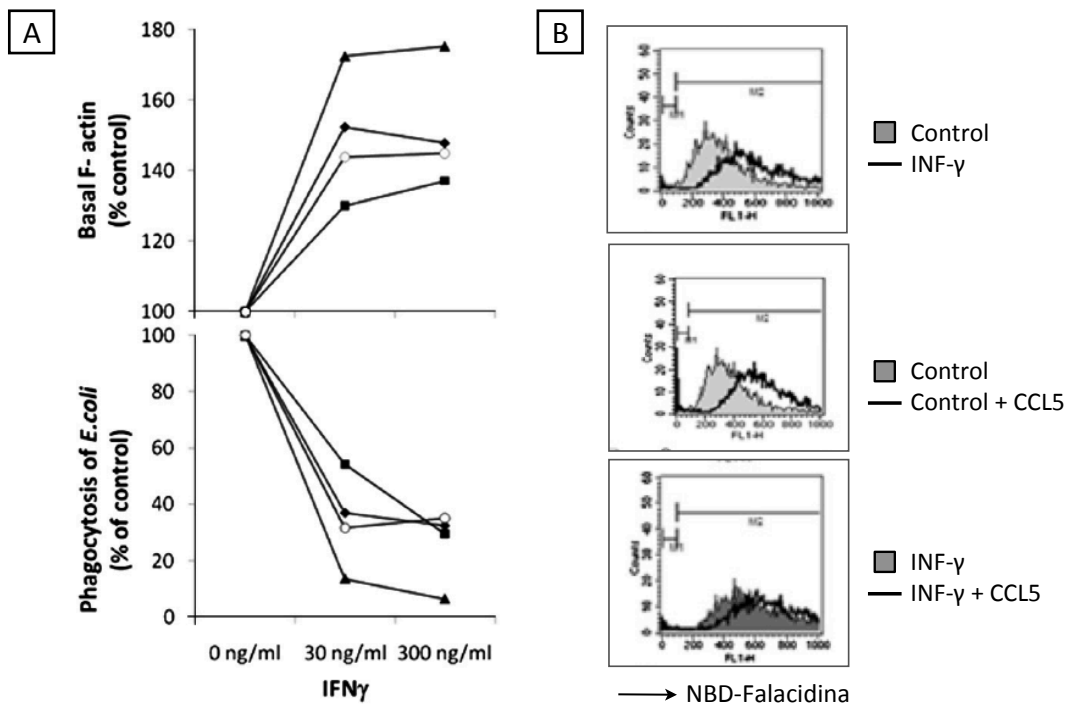


Figura 4. IFN $\gamma$  disminuye capacidad fagocítica y aumenta niveles F-actina basal en de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (M $\phi$ ).

A) Efecto del tratamiento con dos concentraciones de IFN $\gamma$  sobre los niveles basales de F-actina y sobre la fagocitosis de *E. coli* en macrófagos derivados de monocitos de cuatro donadores distintos. Cada tipo de símbolo (triángulos, rombos, etc.) corresponde a células del mismo donador. El porcentaje de F-actina basal se determinó por tinción con NBD-falacidina y citometría de flujo. La fagocitosis de *E. coli* marcada con FITC se determinó por citometría. El aumento en el porcentaje de F-actina basal correlaciona con una disminución en la capacidad de las células para fagocitar bacterias. B) Histogramas de fluorescencia de NBD-falacidina de M $\phi$  con ó sin IFN $\gamma$  en estado basal (histogramas sombreados), y tras el estímulo con CCL5 (histogramas vacíos, línea gruesa). (Frausto del Río, 2011<sup>46</sup>).

por el entrecruzamiento de FcγR (como la fosforilación de la cinasa Syk o el aumento en la concentración intracelular de iones  $Ca^{2+}$ ). Sin embargo, se observó que los niveles basales de actina filamentosa aumentan (hasta 75%) en células tratadas con IFN $\gamma$  (Figura 4AA), y que la cinasa de fosfatidil inositol (PI3-K) está involucrada en el aumento de actina polimerizada. Asimismo, se observó que en las células tratadas con IFN $\gamma$ , el estímulo con la quimiocina CCL5 no induce un aumento en la cantidad de F-actina en la célula (Figura4B), una quimiocina que normalmente promueve de manera inmediata la polimerización de actina.

Estos resultados coinciden con el reporte de Hu<sup>47</sup>, quien describió la falta de respuesta de monocitos tratados con IFN $\gamma$  ante estímulos quimiotácticos, y demostró que este efecto del IFN $\gamma$  es mediado por un mecanismo que involucra la remodelación del citoesqueleto. Sin embargo, mientras que Hu reporta que el IFN $\gamma$  indujo un aumento en niveles basales de activación de las GTPasas Rac y Cdc42, en el laboratorio sólo se detectó un aumento en los niveles de activación de Rac.

No se han identificado más elementos, como proteínas reguladoras río abajo de las GTPasas o río arriba, como factores tipo GEF o GAP, que pudieran modular la polimerización de actina ante el estímulo con IFN $\gamma$ . Tampoco se conoce si el mecanismo por el que pudiese actuar IFN $\gamma$  es a través de la vía canónica de señalización, o vías de señalización independientes de JAK STAT.

## **Objetivo**

Identificar componentes involucrados en la regulación negativa sobre la fagocitosis en células monocíticas.

La hipótesis de trabajo supone que el tratamiento de IFN $\gamma$  altera componentes celulares de la dinámica de ensamblaje de filamentos de actina. Para abordar la pregunta de investigación se plantearon dos estrategias:

Por un lado, se pretendió determinar si la cantidad de actina total expresada en las células pudiera ser uno de los elementos modificados por el IFN $\gamma$ . Así mismo, se decidió implementar métodos que permitieran comparar los cambios en la proporción de F-y G- actina en cultivos tratados con IFN $\gamma$ .

Por otro lado, se buscó establecer un sistema experimental que permitiera contar con un número suficiente de células para realizar los experimentos bioquímicos planteados.

De acuerdo a estas dos abordajes se plantearon los siguientes objetivos particulares:

## **Objetivos Particulares**

1- Determinar el efecto del tratamiento con IFN $\gamma$  sobre la proporción F-/G-actina y la actina total en células monocíticas.

2- Establecer las condiciones adecuadas en una línea celular monocítica humana y monocitos de sangre periférica para el estudio de los mecanismos involucrados en el efecto del IFN $\gamma$  sobre la fagocitosis.

## Estrategia Experimental

Para el cumplimiento del Objetivo particular 1, el primer paso planeado fue la estandarización de un método para comparar de manera semi-cuantitativa la actina total expresada y la proporción entre F- y G-actina en células monocíticas (tanto macrófagos derivados de monocitos (M $\phi$ ) como líneas celulares) tratadas o no con IFN $\gamma$ . Para esto, se exploraron distintas alternativas:

- Separación de F-actina y G-actina por sedimentación diferencial.
- Detección por Western blot de actina en lisados totales y fracciones F/G obtenidas por sedimentación diferencial.
- Tinción intracelular con anticuerpo anti-actina, que reconoce ambas formas (F-actina y G – actina).

Para el cumplimiento del Objetivo particular 2, se evaluó si IFN $\gamma$  induce en células de la línea THP-1, - diferenciadas o no a macrófagos con PMA- efectos sobre la capacidad fagocítica y la polimerización de F-actina similares a los efectos que induce sobre macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (M $\phi$ ). Para esto se realizaron los siguientes experimentos:

- Determinación del nivel de fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados con IgG, por células THP-1, THP-1-PMA y monocitos de sangre periférica tratados y no tratadas con IFN $\gamma$  (30 ng/mL) por 48 hrs.
- Determinación del nivel de F-actina basal por tinción con NBD-falacidina en células THP-1, THP-1-PMA y monocitos de sangre periférica tratados y no tratadas con IFN $\gamma$  (30 ng/mL) por 48 hrs.

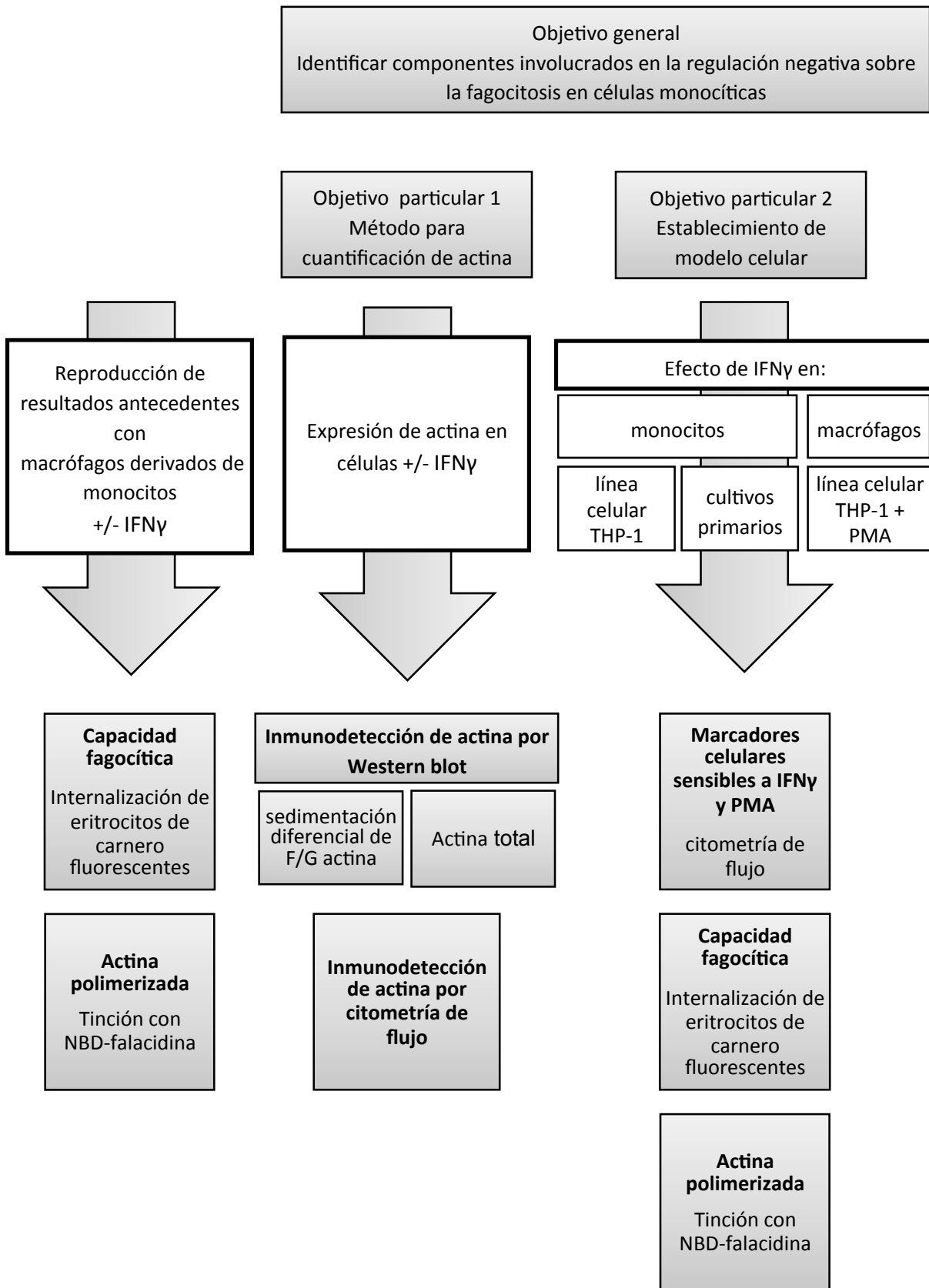


Figura 5. Diagrama de la estrategia experimental implementada a lo largo de este proyecto.

## **Materiales y métodos**

### **Cultivo de células**

Todas las células se cultivaron a 37°C, en atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>, en medio RPM1-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, piruvato de sodio 1mM, solución de aminoácidos esenciales 2mM, L-glutamina 0.1mM y los antibióticos penicilina y estreptomina a 100 U/mL y 100 mg/mL, respectivamente. Las células mononucleares de sangre periférica humana fueron aisladas por gradientes de Ficoll-Hypaque (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) por el procedimiento reportado <sup>46</sup>, a partir de paquetes leucocitarios de donadores sanos. Los paquetes fueron obtenidos del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Las células mononucleares se sembraron en placas de cultivo pre-tratadas con suero humano autólogo, y tras dos horas de adherencia a 37°C, se lavaron para eliminar las células no adherentes. Las células adherentes (enriquecidas en monocitos) se cultivaron por 7 días en medio de cultivo RPMI con 10% de suero fetal bovino, para permitir su diferenciación a macrófagos.

La línea celular THP-1 (*human acute monocytic leukemia*, ATCC No. TIB-202) se cultivó de acuerdo a las indicaciones de la compañía, en medio RPMI con 10% de suero fetal bovino, manteniendo las células en un rango de concentración de 0.2 a 0.8 x10<sup>6</sup> cel/mL. Los cultivos de THP-1 sin PMA (por ser células en continua proliferación) se iniciaron a una concentración de 0.25 x10<sup>6</sup> cel/mL, mientras que los demás cultivos se sembraron a 0.5 x10<sup>6</sup> cel/mL.

Las incubaciones con IFN $\gamma$  se realizaron cultivando las células por 48 horas con 30 ng/mL de IFN $\gamma$  (Peprotech) y medio RPM1-1640 suplementado.

### **Sedimentación diferencial de F-actina y G-actina**

Partiendo de 1x10<sup>6</sup> células de M $\phi$  ó de la línea celular THP-1, se lavaron las células dos veces con buffer P (10 mM PIPES, 50 mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM EGTA, 1mM DTT, pH 7.6, ). Se rompieron las células con detergente en el buffer P de lisis (Buffer P, cocktail de inhibidor de proteasas Roche “complete” 1X, ATP 1mM, 0.5% Tritón, vol. final de lisis 0.2mL) incubando 5 min y se centrifugaron a 12,000 rpm, 5 min a 4°C para separar los componentes solubles e insolubles a Tritón, encontrándose en la fase insoluble los componentes de citoesqueleto, como la actina filamentosa (F-actina) y en la soluble la actina globular (G-actina). Se resuspendió la pastilla en buffer de carga 1X (“sample buffer” 4X: 0.38 g trizma base, 5mL glicerol, 2g SDS, 1.5 g azul de bromofenol, pH 6.8, 23.5mL H<sub>2</sub>O, 1,5 mL Beta-mercaptoetanol) y se hirvieron por 5 min.



La fracción soluble a Tritón (G-actina) se hirvió por 5 min, se precipitó con acetona (15-20 min 4°C, seguido de centrifugación 10 min, 10,000 RPM, 4°C) y resuspendió el precipitado en buffer de carga desnaturizante 1X. Como controles de procesos de polimerización, antes de lisar las células se incubaron con o sin citocalasina-D una hora a 37°C y se agregó CCL5 por 20 segundos [final=0.05 ng/ $\mu$ L]. Durante los ensayos para modificar el balance entre F-y G-actina, se utilizaron distintas condiciones de incubación de los lisados totales, antes del paso de centrifugación a 12,000 rpm. Para ello, se preparó el buffer P de lisis con las distintas especificaciones descritas en la sección de resultados.

## **Western blot**

Para intentar igualar la cantidad de proteína total que se introduce en cada carril de los geles de acrilamida, en los experimentos iniciales, se obtuvieron lisados celulares a partir de  $1 \times 10^6$  células y se cargaron en el gel volúmenes iguales de estos lisados (10 $\mu$ L de extracto total, 45  $\mu$ L de fracción F-actina y 10  $\mu$ L fracción G-actina). En experimentos posteriores, la concentración de proteína se determinó en una alícuota de cada lisado o fracciones, mediante un ensayo tipo Lowry empleando el kit BioRad DC. Se incluyó en cada ensayo una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) disuelta en buffer P, para calcular con ella la cantidad de proteína en las muestras y determinar así la muestra a cargar por carril.

La separación de las proteínas se realizó en geles de acrilamida al 10%, con un voltaje de aproximadamente  $\sim 100$  Volts, utilizando soluciones de corrida y de transferencia estándar, para luego detectar por Western blot la actina en los extractos totales, la fracción soluble y la fracción insoluble (citoesqueleto). Como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo anti-actina (Anti actina Pierce (PA1-16889), anticuerpo policlonal dirigido contra la región N terminal de beta-actina humana (este anticuerpo reacciona con una amplia gama de isoformas de actina de humano y de ratón) a una dilución de 1:2500-1:5000. Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo anti conejo hecho en cabra acoplado a peroxidasa (Zymed) a una dilución de 1:5000. El anticuerpo primario fue el mismo utilizado para las tinciones intracelulares para detección de la cantidad total de actina por citometría de flujo.

Los geles de acrilamida se tiñeron con azul de Coomasie o con nitrato de plata, utilizando el Kit Pierce Color Silver Stain (Thermo Scientific), o soluciones preparadas en el laboratorio.

### **Tinción intracelular anti-actina**

Se tomaron  $.1 \times 10^5$  células por muestra, se lavaron por centrifugación con PBS (pH 7.4) y fijaron en formaldehído al 4%. Se permeabilizó la membrana celular con solución de saponina PERM/WASH (BD Biosciences), por 15 min a temperatura ambiente. Con esta misma solución se realizaron las incubaciones con anticuerpos y lavados posteriores. Para bloquear la unión no específica de anticuerpos, las muestras se incubaron con inmunoglobulina humana comercial (Beriglobina P humana, CSL Behring) como agente bloqueador, por una hora a 4°C. Posteriormente se incubaron con distintas concentraciones de anticuerpo anti-actina, por 30 min a 4°C, y después de lavar, se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con FITC, por 30 min a 4°C, protegido de la luz. Después de la incubación con anticuerpo secundario y nuevos lavados, se evaluó la fluorescencia de las células en el citómetro de flujo.

### **Tinción de F-actina con NBD-falacidina**

Los niveles de F-actina en las células, fueron determinados utilizando la toxina NBD-falacidina (Life Technologies), la cual se une específicamente a actina filamentosa. Se incubaron células [ $5 \times 10^6$  cel/mL] en medio RPMI complementado, por 5 min a 0°C (baño de hielo), y por 5 min exactos a 37°C. Inmediatamente después, las muestras (a una concentración de  $2.5 \times 10^6$  cel/mL) fueron diluidas en medio con o sin un estímulo inductor de la polimerización de actina, por el tiempo indicado (10 segundos para CCL5 y F-actina basal). Se detuvo la reacción añadiendo con un volumen igual de buffer de fijación A (formaldehído 1:5 en PBS) por una hora a 18°C en la oscuridad. Luego, las células fueron permeabilizadas y teñidas con buffer de tinción B (0.2 mg/ml de lisofosfatidil colina, 20 unidades de NBD-falacidina disuelta, formaldehído 5.12% y PBS). Se incubaron una hora a 18°C en la oscuridad para luego ser analizadas por citometría de flujo.

### **Expresión de marcadores por citometría de flujo.**

Para determinar la expresión en membrana del receptor FcγRI y otros marcadores de diferenciación, se colocaron  $1 \times 10^5$  células por muestra, suspendidas en 50 μL de volumen, en placas de 96 pozos. Las células fueron lavadas con buffer de FACS (PBS con 5% de suero fetal bovino y 0.1% de azida de sodio), e incubadas (30 min a 4°C en la oscuridad) con el anticuerpo de interés a una concentración determinada previamente por titulación del anticuerpo. Posteriormente, se lavó la muestra y fijó en PFA al 1%. En las tinciones indirectas, luego de la incubación con el anticuerpo primario, se lavó la muestra y se incubó por 30 min a 4°C en la oscuridad, con anticuerpo secundario fluorescente, para después ser fijadas de la misma manera en PFA y analizadas en el citómetro de flujo.

## **Ensayo de fagocitosis**

Los ensayos de fagocitosis se llevaron a cabo marcando eritrocitos con el fluoróforo intracelular CFSE (*5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester*). Los glóbulos rojos de carnero (GRs) se almacenaron en refrigeración, en solución Alsever, por hasta 14 días. Los tratamientos y lavados posteriores se llevaron a cabo con PBS-BSA (buffer PBS con BSA al 0.1%).

Partiendo de una cantidad inicial de  $1200 \times 10^6$  GRs, se lavaron y tiñeron con CFSE (a una concentración de  $63 \mu\text{M}$ ) por 20 min a  $37^\circ\text{C}$ . Luego, se incubaron en una dilución 1:2 de PBS-BSA con SFB por 15 min a  $37^\circ\text{C}$  y se lavaron para ser utilizados al día siguiente. Se opsonizaron  $200 \times 10^6$  GRs ( $200 \times 10^6$  GRs/mL) con un anticuerpo policlonal anti-eritrocito de carnero producido en conejo (a una dilución de 1:10,000-15,000) por 30 min a temperatura ambiente y agitación suave). Después de lavar, se suspendieron a una concentración final de  $2000 \times 10^6$  GRs/mL. Las células fagocíticas fueron incubadas una hora a  $37^\circ\text{C}$  con GRs opsonizados, en una relación de 1:20, favoreciendo el contacto de las células con los eritrocitos mediante una breve centrifugación. Como controles negativos se incubaron células a  $4^\circ\text{C}$  con eritrocitos opsonizados, y células a  $37^\circ\text{C}$  con eritrocitos no opsonizados (fagocitosis no específica). Luego de la incubación por una hora, se lisaron los eritrocitos no internalizados mediante un choque hipoosmótico (con agua destilada) por un minuto. La reacción de lisis fue detenida adicionando una solución concentrada de PBS para llevar a una concentración final 1X. Los restos de eritrocitos lisados fueron lavados por centrifugación y se fijó la muestra con PFA al 1%. Se cuantificó el porcentaje de células CFSE positivas y la media geométrica de emisión de fluorescencia de una población de 10,000 células.

## **Diferenciación de THP-1 con PMA**

Se utilizó el compuesto forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) como estímulo para inducir la maduración de células de la línea pro monocítica THP-1 a células tipo macrófagos. Se siguió un protocolo similar al reportado por Daigneault y colaboradores <sup>29</sup>, estandarizado previamente en el laboratorio. Se cultivaron las células por cuatro días con 20 nM de PMA disuelto en DMSO (concentración final de DMSO de 20 nM). Al segundo día de cultivo se hizo un cambio de medio y PMA. Al día 4 de cultivo se retiró el PMA y se cultivaron las células por 3 días en medio sin PMA y finalmente se cultivaron dos días en presencia o ausencia de IFN $\gamma$ . Para utilizar las células, se desecharon aquellas que flotaran y se enjuagaron los pozos con PBS frío. Se adicionó a los pozos EDTA 1mM y se incubó por 5 minutos. Luego, se despegaron con pipeteo suave del líquido sobre la base de los pozos y se retiró la suspensión.

## Citometría de flujo

Para la determinación de marcadores de membrana por inmunofluorescencia, la tinción intracelular anti-actina, el nivel de F-actina con NBD-Falacidina y la cuantificación del índice fagocítico, se utilizaron los citómetros Attune® (Life Technologies) o FACSCalibur® (BD Biosciences), con los programas contenidos en cada aparato (Attune Cytometer Software o CellQuest, respectivamente). Para cada experimento, se definió una región con valores *Forward Scatter* (FSC) y *Side Scatter* (SSC) fijas y se analizó la fluorescencia de dicha población, capturando 10,000 eventos por muestra. Se obtuvo el valor de fluorescencia del parámetro -H en el canal de emisión de acuerdo al fluoróforo utilizado. Se utilizó el valor de media geométrica de fluorescencia. En los casos indicados (con el símbolo  $\Delta$ ), se sustrajo al valor de la muestra teñida, el valor de media geométrica de la misma muestra sin teñir. Los datos se analizaron con el programa Attune Cytometer Software o el programa FlowJo.

## Resultados

### 1 Efecto del IFN $\gamma$ sobre la fagocitosis y polimerización de actina en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (M $\phi$ )

Para retomar los experimentos antecedentes y adquirir la habilidad necesaria en las técnicas requeridas, se realizaron los experimentos previamente descritos en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica.

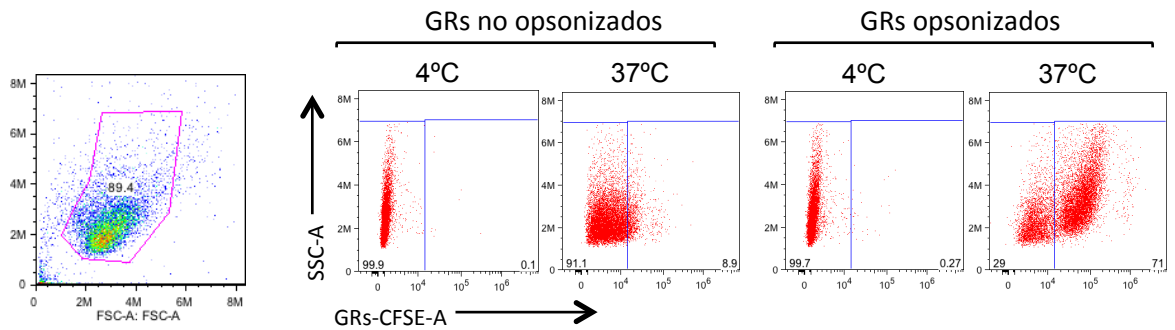
En la [Figura 6](#) se muestran los resultados de un ensayo típico de fagocitosis; en el panel 8A, una gráfica de puntos de citometría de flujo donde se selecciona la población de interés, así como las gráficas de fluorescencia de glóbulos rojos de carnero (GRs) fluorescentes internalizados en los fagocitos. Debido a que el proceso fagocítico requiere de energía, y por lo tanto de células metabólicamente activas, en las incubaciones a 4°C no se detectan GRs internalizados. La fagocitosis mediada por receptores para inmunoglobulinas es un proceso altamente eficiente. Por ello, la fagocitosis de eritrocitos no opsonizados con anticuerpos, mediada por otra serie de receptores en la célula, es considerablemente menor. Durante estos ensayos, se cuantificó el número de fagocitos fluorescentes (que contienen eritrocitos en su interior, [Figura 6B izquierda](#)) y la cantidad relativa de fluorescencia emitida por estos (interpretado como la cantidad de eritrocitos internalizados en cada célula, [Figura 6B centro](#)). El producto de estos dos valores es el índice fagocítico ([Figura 6B derecha](#)) y así se reportan los resultados siguientes. Los controles a 4°C y GRs sin opsonizar se realizaron para todos los ensayos descritos en adelante.

Se pudo confirmar el efecto del IFN $\gamma$  sobre la capacidad fagocítica en este tipo celular, al observar una importante disminución del número de GRs fagocitados por estas células ([Figura 7A](#)). Esto se advierte no sólo para la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ Rs, sino también para el índice fagocítico de GRs no opsonizados, lo que indica que el efecto de la citocina sobre la fagocitosis es un efecto que no depende del receptor involucrado.

La cantidad de F-actina se evaluó mediante una tinción con NBD-falacidina, la cual se une de manera específica a la forma filamentosa de actina<sup>48</sup>. La cantidad de F-actina es mayor en macrófagos incubados con IFN $\gamma$  en condiciones basales. Al estimular las células con la quimiocina CCL5 la polimerización de actina es menor en las células tratadas con IFN $\gamma$  ([Figura 7B](#)).

Habiendo obtenido los resultados antecedentes a este proyecto, se procedió a establecer una metodología para determinar los niveles de actina total y fracciones F-y G-actina en células monocíticas.

A



B

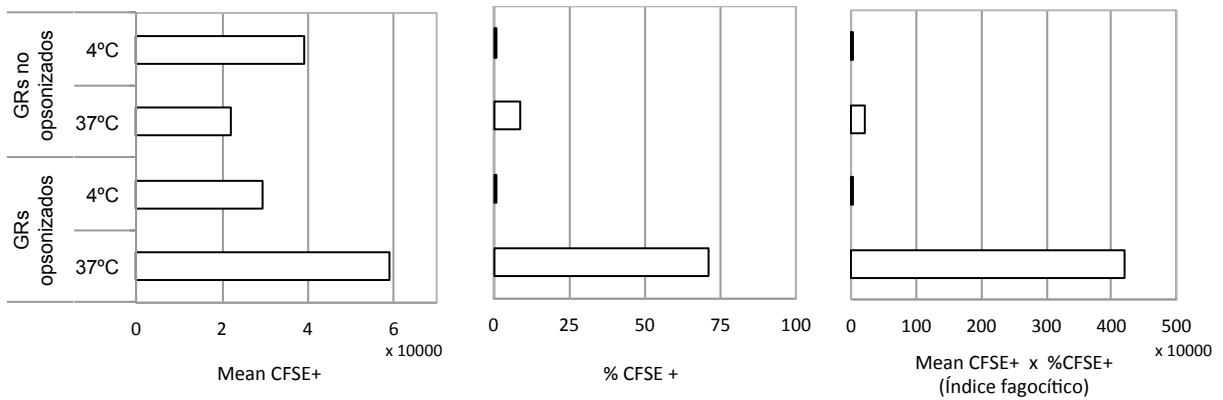


Figura 6. Resultados característicos de un ensayo de fagocitosis.

A) Panel izquierdo: gráfica de puntos mostrando valores de *Forward-scattered light* (FSC) y *Side-scattered light* (SSC) en una población de fagocitos. Panel derecho: Muestras de un ensayo típico de fagocitosis incubando células con GRs opsonización y no opsonizados de incubaciones a 4°C y 37°C. Gráfica de puntos mostrando el valor de SSC (eje y) y de fluorescencia (eje x) correspondiente a glóbulos rojos teñidos con el fluoróforo CFSE (GRs-CFSE-A), contenidos en la población de fagocitos.

B) Gráfica de valores obtenidos para: media geométrica de fluorescencia del compuesto CFSE, porcentaje de células CFSE-positivas (definida la región positiva como se muestra en panel A) Índice fagocítico, obtenido por la multiplicación de los dos valores anteriores para cada muestra.

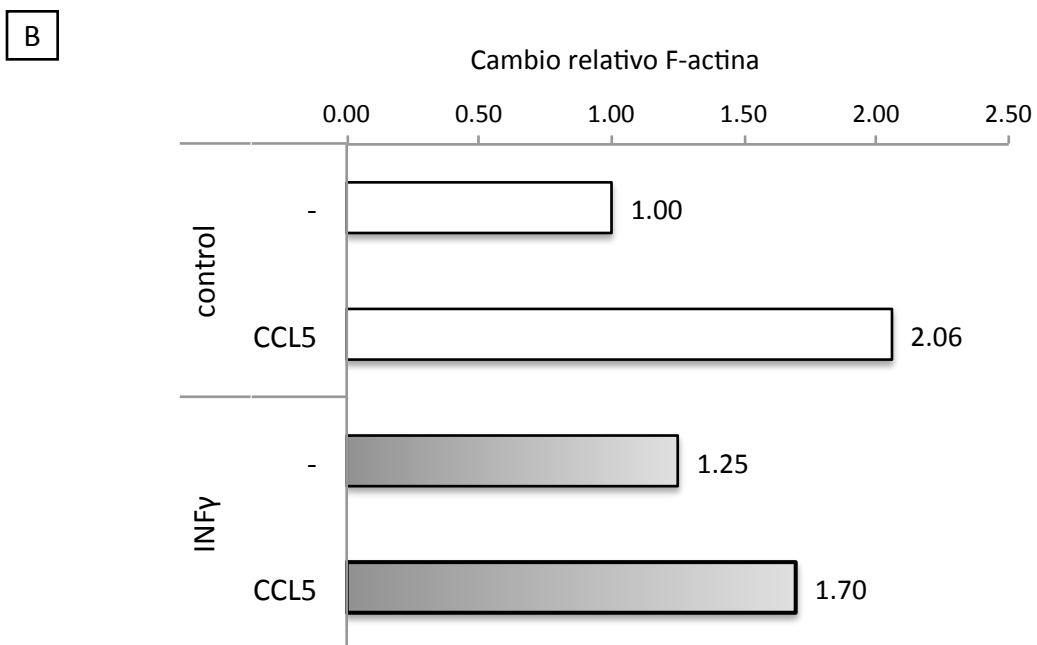
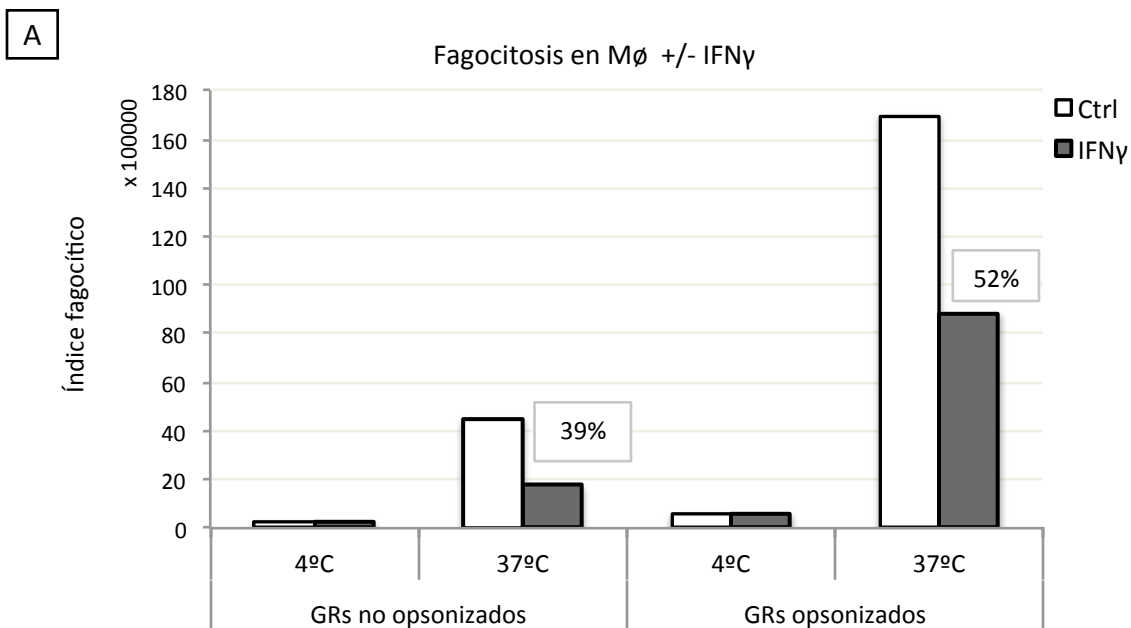


Figura 7. Fagocitosis y F-actina en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica. Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero (GRs) teñidos con CFSE por Mø cultivados con o sin IFN $\gamma$ . A) Índice fagocítico, calculado como el porcentaje de células CFSE+, por la media geométrica de fluorescencia de la misma región. GRs opsonizados o no opsonizados con anticuerpo anti-glóbulo rojo. Las muestras fueron incubadas a 4 o 37°C. Se muestra en los recuadros el porcentaje del índice fagocítico de cultivos con IFN $\gamma$  respecto a su muestra control. B) Cuantificación de F-actina en cultivos con o sin IFN $\gamma$ , niveles basales y después de estimulación con CCL5 [50 ng/mL] por 20 segundos. Tinción de células con NBD-falacidina detectada por citometría de flujo. Cambio relativo de media geométrica en la población NBD-falacidina positiva.

## 2. Estandarización de protocolos para cuantificación de actina

### 2.1 Detección en extractos celulares por Western blot

#### 2.1.1 Separación de F y G-actina

Se han reportado en la literatura varios protocolos que permiten separar la forma polimerizada (F-actina) y la forma soluble (G-actina) a partir de extractos celulares. Haciendo inmuno detecciones por Western blot de las formas F-/G- actina se podrían determinar los cambios en el estado de polimerización del citoesqueleto de actina inducidos por el tratamientos con IFN $\gamma$  <sup>49,50</sup>. Para ello, se buscaron condiciones óptimas de lisis, electroforesis e inmuno detección.

Sabiendo que la quimiocina CCL5 genera, en células responsivas, ondas de polimerización del citoesqueleto de actina de manera inmediata y que se ha detectado este aumento en la cantidad de F-actina en experimentos anteriores mediante tinción con NBD-falacidina, se exploró el uso de esta quimiocina como posible control positivo de polimerización en nuestras células. También se utilizó citocalasina-D como control negativo pues la toxina impide la unión de más monómeros de actina en un filamento, evitando su prolongación. Con estas condiciones, se esperaba provocar cambios en la distribución F-/G- actina en los extractos celulares.

De acuerdo a lo descrito en métodos, se realizaron extracciones de los componentes de citoesqueleto (F-actina) y componentes solubles (G-actina). Se utilizó un primer anticuerpo anti-actina que revela de manera semi específica una banda correspondiente al peso aproximado del monómero de actina (43 kDa) en Western blots. Como se muestra en la Figura 8A, a pesar de un patrón anormal de corrida en las muestras, no hay cambios aparentes en los cultivos con y sin citocalasina-D. Sin embargo, en el cultivo estimulado con CCL5 sin citocalasina-D, aumenta la señal de banda de F-actina (Figura 8A, indicada con una flecha). Cuando el cultivo es pre tratado con citocalasina-D y se adiciona CCL5, no se observa el aumento inducido por la quimiocina. Esto indicaría que la citocalasina-D disminuye la formación de F-actina.

Se repitió el experimento disminuyendo la cantidad de muestra en las fracciones solubles y aumentando la de citoesqueleto. También, se optimizó la forma de solubilizar los botones de las fracciones de F-actina. Como se observa en la Figura 8B, la calidad de las bandas aumentó. Sin embargo la señal de las bandas correspondientes a F-actina son demasiado tenues. Al incrementar en el gel la cantidad de proteína total de las distintas fracciones se observó señal de productos proteicos de menor peso molecular en las muestras de extractos total y citoesqueleto, con o sin CCL5 (Figura



8C). Esto pudiera ser consecuencia de la degradación de actina proveniente de filamentos en citoesqueleto o de la unión inespecífica a componentes de citoesqueleto. Para determinar si la detección distintas bandas se debía a inespecificidad del anticuerpo, se utilizó otro anticuerpo anti-actina (Figura 8D). En este caso, se detecta una banda correspondiente al peso de actina en todas las

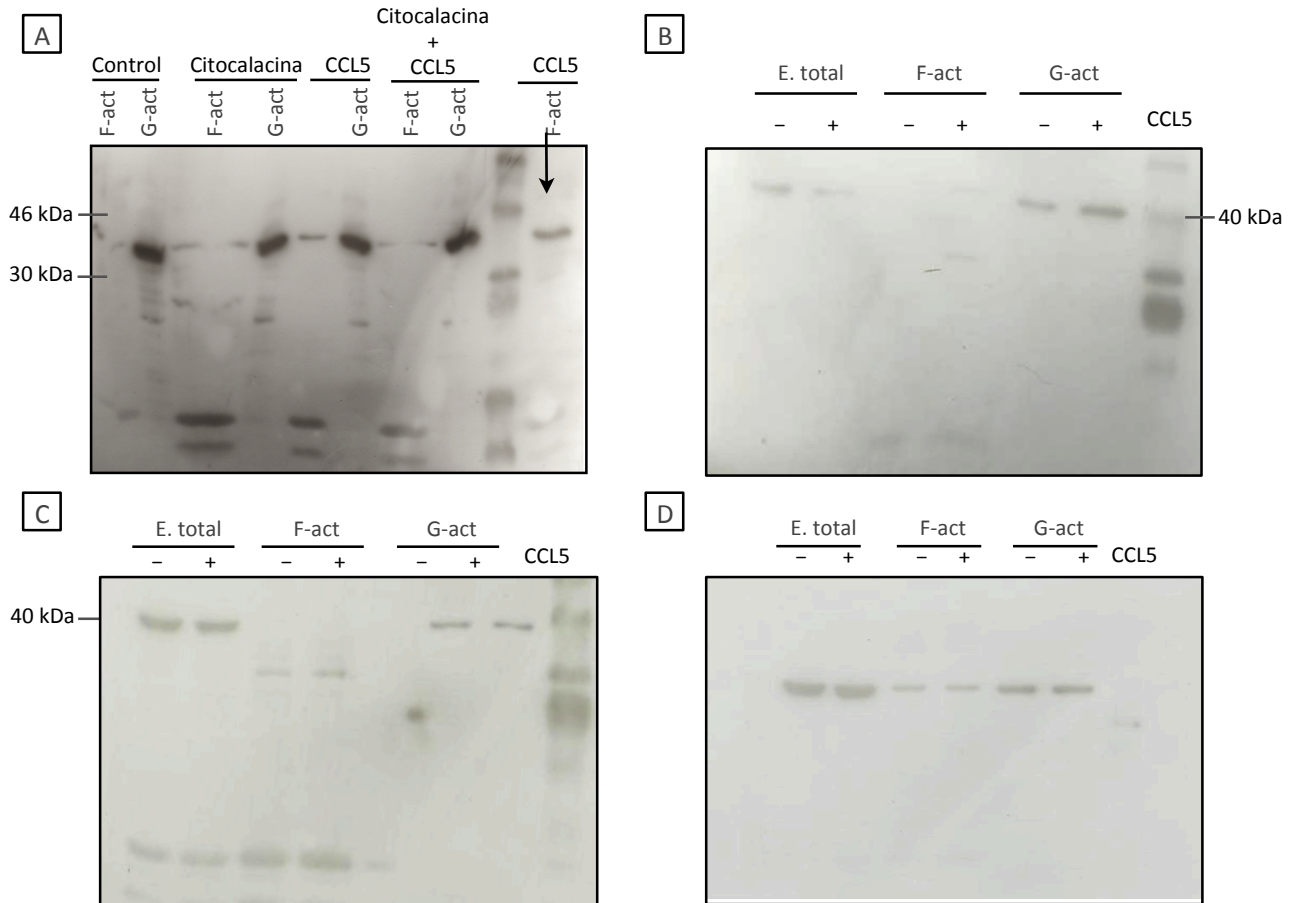


Figura 8. Estandarización de condiciones para inmuno detección de actina por Western blot.

- A) Lisis de extractos de THP incubadas con o sin citocalasina y con o sin CCL5. Separación de fracciones F-actina y G-actina.
- B) Ajuste de condiciones de corrida de gel de acrilamida.
- C) Ajuste de cantidad de proteína total cargada; extracto total (E.total) 30 ng, F-actina 50 ng, G-actina 15 ng.
- D) Ajuste de anticuerpo utilizado. Mismas muestras que la sección C. , reveladas con otro anticuerpo anti-actina.

fracciones sin señales inespecíficas o productos de menor tamaño. Por ello, se decidió dejar de utilizar el primer anticuerpo y utilizar en adelante el anticuerpo Pierce (como se detalla en Métodos).

Cabe mencionar que la detección de actina se utiliza rutinariamente como control de carga en este tipo de experimentos. A falta de otro anticuerpo para utilizar y una proteína blanco de expresión estable bajo los tratamientos que se contemplaban realizar, se utilizó como control de carga la cuantificación de proteína total a cargar en los geles por ensayo de Lowry, como se describe en

métodos. Debido a la pequeña cantidad de proteína total cargada, las tinciones del gel de acrilamida con azul de coomasie no permitieron comparar la cantidad de proteína cargada en los geles. Tampoco lo permitió la tinción de membranas de nitrocelulosa con rojo de Ponceau. Se probaron entonces tinciones por nitrato de plata, verificando que la señal fuese similar entre los carriles de cada fracción. Una vez establecidas las condiciones óptimas de electroforesis y anticuerpos necesarios, se procedió a buscar las condiciones experimentales que permitieran confirmar la adecuada separación de las fracciones de citoesqueleto (F-actina) y solubles (G-actina) por sedimentación diferencial.

## 2. Estandarización de protocolos para cuantificación de actina

### 2.1 Inmuno detección en extractos celulares por Western blot

#### 2.1.2 Modificación de balance F-/G- actina *in vitro*

La estimulación de células con CCL5 provoca polimerización de actina a tiempos cortos (alrededor de 10 seg), que posiblemente no es detectable después de los lavados de la suspensión celular, incubaciones de lisis y la centrifugación para separar las fracciones correspondientes a F y G actina.

Por ello, se buscaron otras condiciones que modificaran el balance entre F-/G-actina y se probó la detección de dicho cambio por Western blot. De acuerdo a Cano y colaboradores, es posible modificar la concentración crítica necesaria para alargar los filamentos de actina, alterando condiciones de incubación de los lisados celulares tales como la concentración de sales, el tiempo de incubación, la concentración de ATP o la concentración celular en el lisado <sup>51</sup>. En la [Figura 9](#), se indican las condiciones de lisis usadas en cuatro experimentos independientes así como la modificación al balance F-/G-actina esperado.

Aunque se perdió la muestra de extracto total de la condición control del experimento 1, comparando la intensidad de las bandas entre las fracciones F-actina y G-actina, se observó que la relación entre estas bandas cambió en algunos tratamientos. Por ejemplo, cuando los lisados se incubaron 85 minutos antes de sedimentarse (en lugar de 5 minutos como la condición de referencia), aumenta la banda de G-actina y disminuye la de F-actina, de acuerdo a lo esperado.

Lo mismo sucedió al utilizarse amortiguadores sin ATP, sin Magnesio/Calcio, o una mayor concentración de 1.2M KCl (1.2 M).

En la muestra con alta concentración la banda de F-actina está enriquecida, y este enriquecimiento se pierde en la muestra que fue previamente incubada con Citocalasina D. Las condiciones donde los cambios son más evidentes fueron en la muestra sin ATP y la muestra con alta concentración celular. Sin embargo, el resultado observado en condiciones de lisis sin ATP del primer experimento probablemente se debió a una irregularidad del gel en particular, pues como se muestra en la misma [Figura 9](#), en experimentos posteriores (y volviendo a correr la muestra de dicho experimento) no se observaron cambios en las fracciones F y G, comparados con el control. Tampoco se reprodujo la observación del tratamiento con Citocalasina D del experimento 1, en la cual la formación de F-actina, inducida por una alta concentración celular, es inhibida por el tratamiento con Citocalasina.

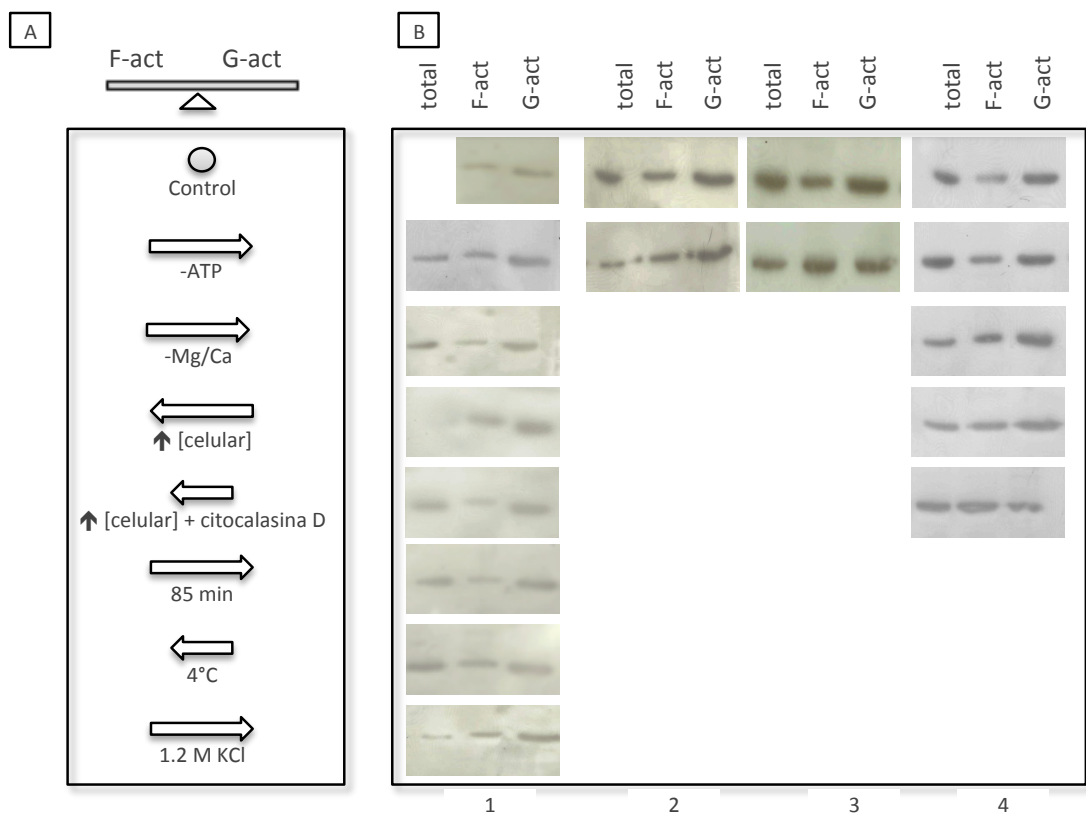


Figura 9. Separación de F- y G-actina de células sometidas a distintos tratamientos inductores de polimerización de actina.

En la primera columna se indica esquemáticamente el efecto esperado sobre el balance en las proporciones de actina filamentososa y globular (F- y G-act, respectivamente), con las distintas condiciones de incubación de los lisados totales.

Condiciones control: Lisis a 37°C, 1 x10<sup>6</sup>cel, [5 x10<sup>6</sup>/mL], 0.2mL vol final de lisis, buffer P (véase métodos).  
 Condiciones ensayadas: Incubación en buffer sin ATP (-ATP), Incubación en buffer sin Magnesio o calcio (-Mg/Ca), Incubación en buffer a una alta concentración celular de 12x10<sup>6</sup> cels/mL (↑[celular]), Incubación en buffer a una alta concentración celular con citocalasina D en el medio (↑ [celular] citocalasina D), Incubación del lisado por 85 min , incubación del lisado a 4°C, o Incubación en buffer con mayor concentración de KCl (1.2 M KCl). En las columnas siguientes se muestran los Western blots anti-actina de: extracto total, fracción filamentososa y fracción de actina globular en 4 experimentos (indicados en la parte inferior). Extracciones hechas en las condiciones indicadas en el panel izquierdo. Se cargaron los mismos volúmenes de muestra para el control y las fracciones F-actina y G-actina.

Los experimentos realizados no reflejan cambios en las proporciones de las fracciones de F-y G-actina inducidos por los tratamientos empleados. En algunos casos se observan diferencias entre las bandas de F y G actina, mas no de manera reproducible. Esto puede deberse a que las condiciones hasta ahora probadas no son las óptimas. Además, existen en la literatura muchas variaciones sobre la velocidad y temperatura de sedimentación que podrían probarse. Sin embargo, se cuenta también con la metodología de cuantificación de F-actina mediante otro método (tinción de F-actina y cuantificación por citometría de flujo como se describe mas adelante). Por ello, se decidió interrumpir estos experimentos y en los siguientes determinar únicamente la cantidad de actina total por Western blot en extractos celulares totales (sin fraccionar).

## 2. Estandarización de protocolos para cuantificación de actina

### 2.1. 2 Inmuno detección de actina en extractos celulares por Western blot

#### 2.1.3 Cantidad de actina total en células con IFN $\gamma$

Como se ha mencionado antes, la formación de filamentos de actina depende de un equilibrio (concentración crítica) entre la cantidad de actina en forma globular y en forma de filamentos. Aunado a la actividad de proteínas que regulan la formación de filamentos, el aumento en la cantidad de F-actina de células con IFN $\gamma$  pudiera deberse a un aumento general en la cantidad de monómeros de actina producida en dichas células. Esto resultaría en un desplazamiento del equilibrio y una mayor cantidad de F-actina. Por ello, se quiso establecer si en cultivos tratados con IFN $\gamma$  la cantidad total de actina expresada es similar a la de cultivos control. Se realizaron extractos de cultivos sin separar fracciones solubles o insolubles a Tritón X-100, buscando cuantificar la cantidad de actina en extractos celulares totales. En la [Figura 10](#) se muestran los resultados obtenidos con extractos celulares tanto de macrófagos derivados de monocitos (M $\phi$ ), como de células THP-1 cultivadas 48 horas con o IFN $\gamma$ . En los M $\phi$  se obtuvieron resultados variables entre los cultivos control y los tratados con IFN $\gamma$  (señal de muestras con IFN $\gamma$  igual, menor y mayor que muestras control). Respecto a los cultivos de células THP-1, se observa una menor cantidad de actina en algunos de los cultivos tratados con la citocina. Se realizaron mediciones por densitometría para cuantificar la intensidad de las bandas, y no se observó un patrón constante ni por lo tanto, diferencias significativas. En la tinción con nitrato de plata se detectan cantidades similares de proteínas entre los tratamientos de experimentos (no mostrado).

Debido que no se obtiene una tendencia reproducible entre los experimentos descritos arriba, se decidió hacer una prueba de la sensibilidad de la señal densitométrica a variaciones en la cantidad de actina por carril. Esto se realizó corriendo en paralelo lisados de cantidades conocidas de células idénticas y haciendo el análisis densitométrico. En la [Figura 11](#) se puede observar que al correr muestras de lisados con cantidades cada vez menores de células, la señal de actina disminuye. Sin embargo, es notorio que al disminuir al 50% la cantidad de células de las que proviene el lisado (en el rango de números de células empleados en los experimentos), no se observa una disminución correspondiente del 50% en la intensidad de las bandas. Además, los resultados de densitometría varían según la película utilizada para capturar la imagen quimioluminiscente del blot<sup>52</sup>. Lo anterior indica que esta metodología no tiene la sensibilidad y precisión necesaria para hacer evidentes cambios incluso sustanciales en la cantidad de actina total entre muestras, por lo que los cambios en

la cantidad total de actina que pudiese estar induciendo el IFN $\gamma$ , tendrían que ser de casi un orden de magnitud para esperar que pudiésemos detectarlos por esta metodología.

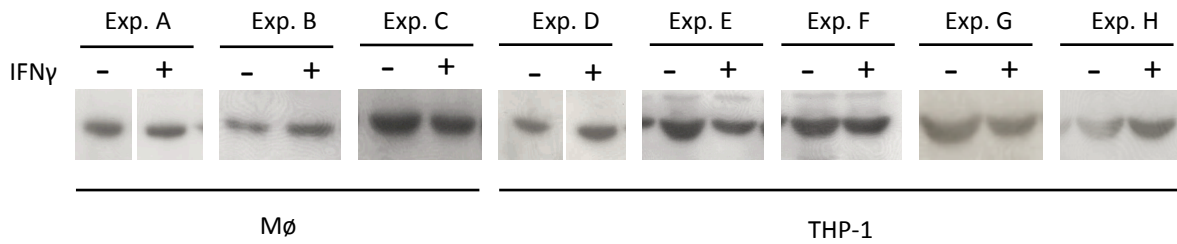


Figura 10. Western blot anti-actina en extractos totales de células tratadas o no con IFN $\gamma$ . Macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (M $\phi$ ) o monocitos THP-1 fueron cultivados 48 horas con o sin 30 ng/mL de IFN $\gamma$ . Se obtuvieron lisados de  $1 \times 10^6$  células, y se cargaron en carriles del mismo gel, volúmenes iguales de ambos lisados de cada experimento. En otros experimentos, se cargaron 20-25 ng de proteína total de cada lisado. Se realizó el revelado con con anticuerpo anti-actina y un anticuerpo secundario acoplado a HRP. Se muestra el resultado de 8 experimentos independientes (Exp.A-H). Se indica con signo negativo las muestras de células sin tratar (control) y con signo positivo las tratadas con IFN $\gamma$

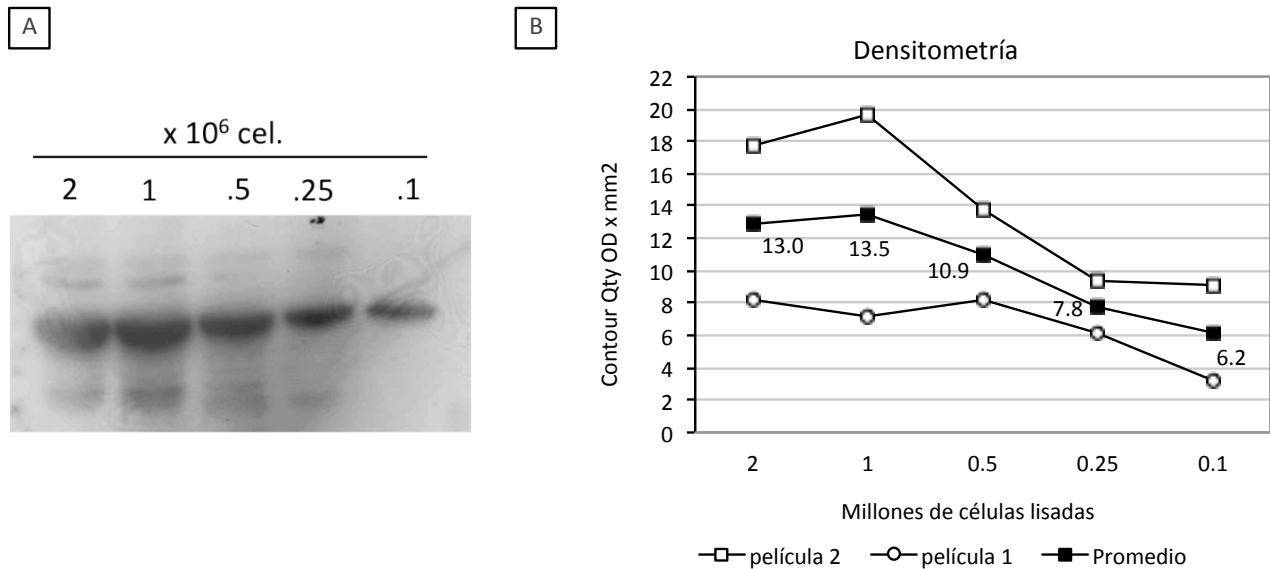


Figura 11. Western blot anti-actina de células THP-1. Curva de concentración celular en el lisado total. A) Cantidades decrecientes de células THP-1 fueron lisadas, y se cargaron en el gel volúmenes iguales de cada lisado. La actina fue inmunodetectada en los blots con anticuerpo anti-actina y un anticuerpo secundario acoplado a HRP. B) Densitometría de la membrana. La membrana de nitrocelulosa fue revelada y la imagen fue capturada en dos películas fotográficas diferentes. Las imágenes fueron digitalizadas con el analizador GelDoc (BioRad) y analizadas con el software Quantity One. Se muestra la densidad óptica por mm<sup>2</sup> de banda en cada película y el promedio de densidad de ambas.

## 2. Estandarización de protocolos para cuantificación de actina

### 2.2 Detección de actina total por citometría de flujo

Usando el mismo anticuerpo utilizado para los ensayos de inmuno detección por Western blot, se hicieron ensayos para detectar y cuantificar la actina intracelular por citometría de flujo. Una cualidad de esta metodología, en comparación del Western blot, es que los resultados no varían según la cantidad de células utilizadas inicialmente o según la cantidad de muestra cargada, ya que el instrumento mide individualmente la señal fluorescente de cada célula, por lo que la captura de 10,000 células es suficiente para obtener un estimado válido de la intensidad de señal en una población celular. Por lo tanto, se requiere un número menor de células para realizar el ensayo.

Se llevaron a cabo inmunofluorescencias indirectas, haciendo tinciones intracelulares de cultivos tratados con y sin IFN $\gamma$ , de acuerdo a lo descrito en métodos. Se utilizó anticuerpo policlonal anti-actina (Pierce) que en ensayos de Western blot identificó solamente una banda de peso molecular cercano a 45 kDa ([Figura 10](#)). En la [Figura 12](#) se muestra una inmunofluorescencia indirecta de macrófagos derivados de monocitos tratados o no con IFN $\gamma$ . Se observa que las células tratadas con IFN $\gamma$  (histograma en rojo) muestran una señal de fluorescencia más alta que las células no tratadas. Sin embargo, estos resultados no son reproducibles. La [Figura 13](#) muestra un resumen de varios experimentos en que macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, y monocitos THP-1 fueron tratados con IFN $\gamma$  y fueron teñidos con el anticuerpo anti-actina. Como se observa en la [Figura 13](#), la cantidad de actina, medida como la media geométrica de fluorescencia, no cambia significativamente en cultivos tratados con IFN $\gamma$ .

Cuando se realizó la titulación de anticuerpo anti-actina, no se identificó un punto donde la fluorescencia no aumentara directamente conforme a la concentración de anticuerpo (datos no mostrados). Esto sugiere que no se alcanzó la saturación (lo cual pudiese estar relacionado a la abundancia de actina en las células) o bien implicar que hay unión inespecífica del anticuerpo. No es viable emplear concentraciones mayores a las probadas pues requeriríamos de cantidades de anticuerpo inalcanzables por el costo de los mismos.

Hasta este punto, se realizaron experimentos para la estandarización de métodos usando cultivos primarios de monocitos diferenciados in vitro a macrófagos y cultivos de la línea celular THP-1. Los experimentos realizados muestran que: o no se están produciendo cambios en la cantidad de actina como resultado del tratamiento con IFN $\gamma$ , o bien, que los cambios, por su magnitud, no son

detectables con las metodologías implementadas. Por ello, se procedió a establecer si el IFN $\gamma$  tiene un efecto sobre las células monocíticas THP-1 y, si lo hubiese, investigar su mecanismo de acción.

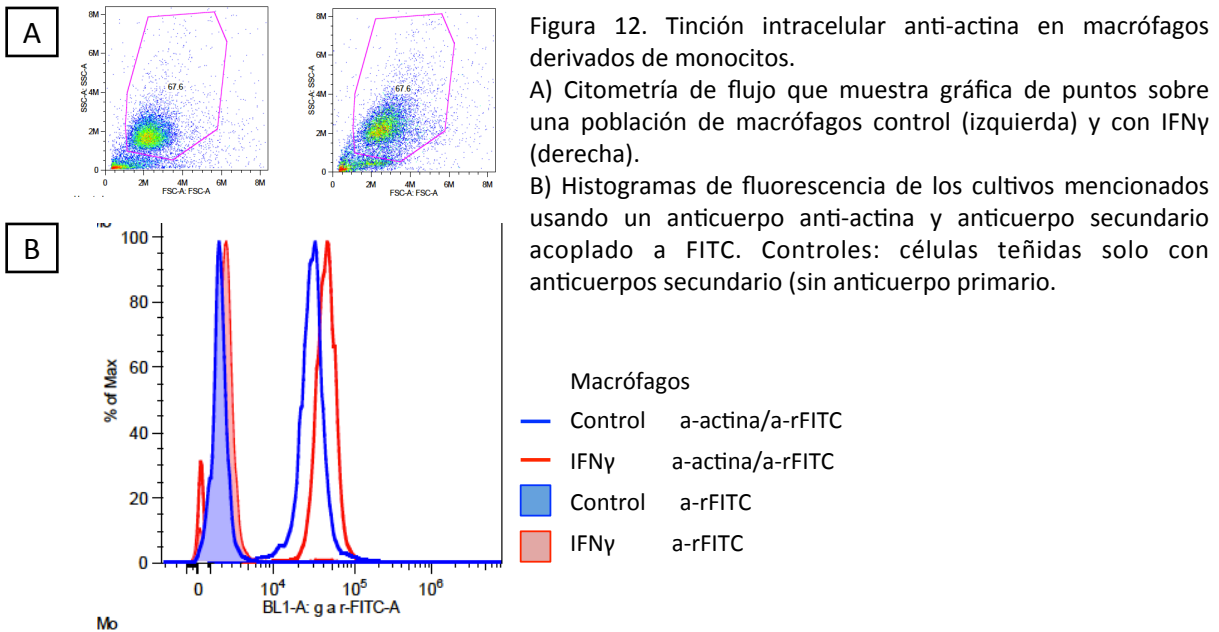


Figura 12. Tinción intracelular anti-actina en macrófagos derivados de monocitos.

A) Citometría de flujo que muestra gráfica de puntos sobre una población de macrófagos control (izquierda) y con IFN $\gamma$  (derecha).

B) Histogramas de fluorescencia de los cultivos mencionados usando un anticuerpo anti-actina y anticuerpo secundario acoplado a FITC. Controles: células teñidas solo con anticuerpos secundario (sin anticuerpo primario).

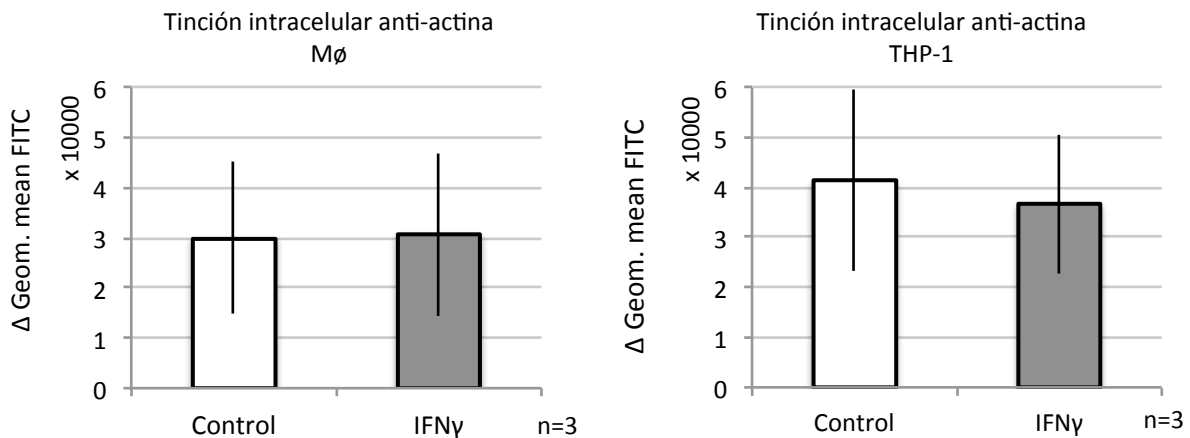


Figura 13. Tinción intracelular anti-actina de macrófagos derivados de monocitos y células THP-1.

Tinción con anticuerpo anti-actina y anticuerpo secundario acoplado a FITC, de macrófagos derivados de monocitos (izquierda) o células THP tratadas con PMA (derecha), incubadas 48 horas con o sin IFN $\gamma$ , (30 ng/mL). ( $\Delta$ Geom. mean FITC= media geométrica de fluorescencia de la muestra teñida, menos media geométrica de muestra sin teñir). Se indica la desviación estándar y número de experimentos independientes (n).



### 3. Establecimiento de modelo en línea celular THP-1

#### 3.1 Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos de la línea celular THP-1

##### 3.1.1 Expresión de marcadores de membrana

El Objetivo particular 2 de este trabajo, es el establecimiento de un sistema experimental adecuado para el estudio de los mecanismos involucrados en el efecto del IFN $\gamma$  sobre la fagocitosis. Para cumplir este objetivo, se caracterizó el efecto del tratamiento con IFN $\gamma$  sobre células de la línea THP-1 y sobre monocitos de sangre periférica sin diferenciar a macrófagos.

Por observaciones previas en el laboratorio sabemos que en general, las células que han sido expuestas a IFN $\gamma$  muestran cambios morfológicos, como un mayor tamaño y granularidad, además de proliferar más lentamente que las células control. Para evaluar la actividad del IFN $\gamma$ , además de observar la morfología de las células, se determinaron por inmunofluorescencia los cambios en la expresión de receptores de membrana provocados por el IFN $\gamma$  en esta línea celular. Se evaluó la expresión del receptor tipo I de inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ RI), pues se sabe que el IFN $\gamma$  aumenta la expresión de este receptor en células mieloides humanas, incluyendo la línea THP-1<sup>53,54,55</sup>. Conforme a lo esperado, en las células tratadas con IFN $\gamma$  aumentó la expresión del receptor dos veces en relación a las células control (Figura 14A, primer panel y B).

Así mismo, se evaluó el efecto del IFN $\gamma$  sobre la expresión de HLA-DR, una importante molécula involucrada en la presentación antigénica en células como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Existen reportes con información contradictoria sobre la expresión de esta molécula en la línea THP-1<sup>56,57,31</sup>. Según los resultados obtenidos en este trabajo, las células THP-1 en condiciones normales no expresan HLA-DR, ya que las tinciones muestran fluorescencia equivalente a las muestras sin teñir. (Figura 14A segundo panel y 14B). Este fenómeno parece ser una particularidad de la línea THP-1, pues los monocitos y linajes progenitores suelen expresar dicha molécula. No obstante, al exponer estos cultivos a IFN $\gamma$  por 48 horas, se indujo la expresión de HLA-DR prácticamente en todas las células.

También se determinó la expresión de los marcadores CD80 y CD11b. Estos dos marcadores no se expresan en los cultivos, ya sea con o sin IFN $\gamma$ . Sabiendo entonces que la expresión del receptor Fc $\gamma$ RI aumenta, que la molécula HLA-DR se induce y CD80 no se expresa en células tratadas con IFN $\gamma$ , se cuenta con una forma de monitorear la actividad de la citocina sobre las células.

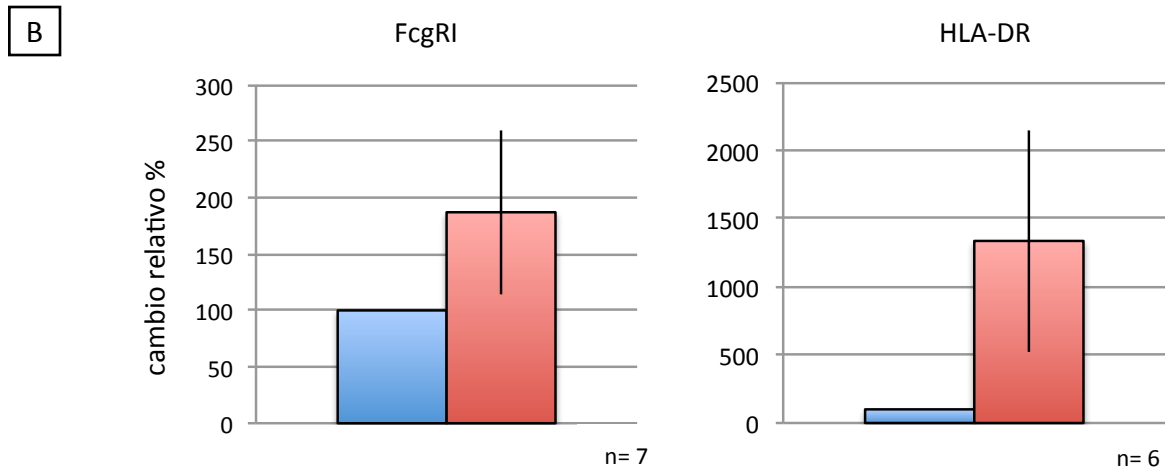
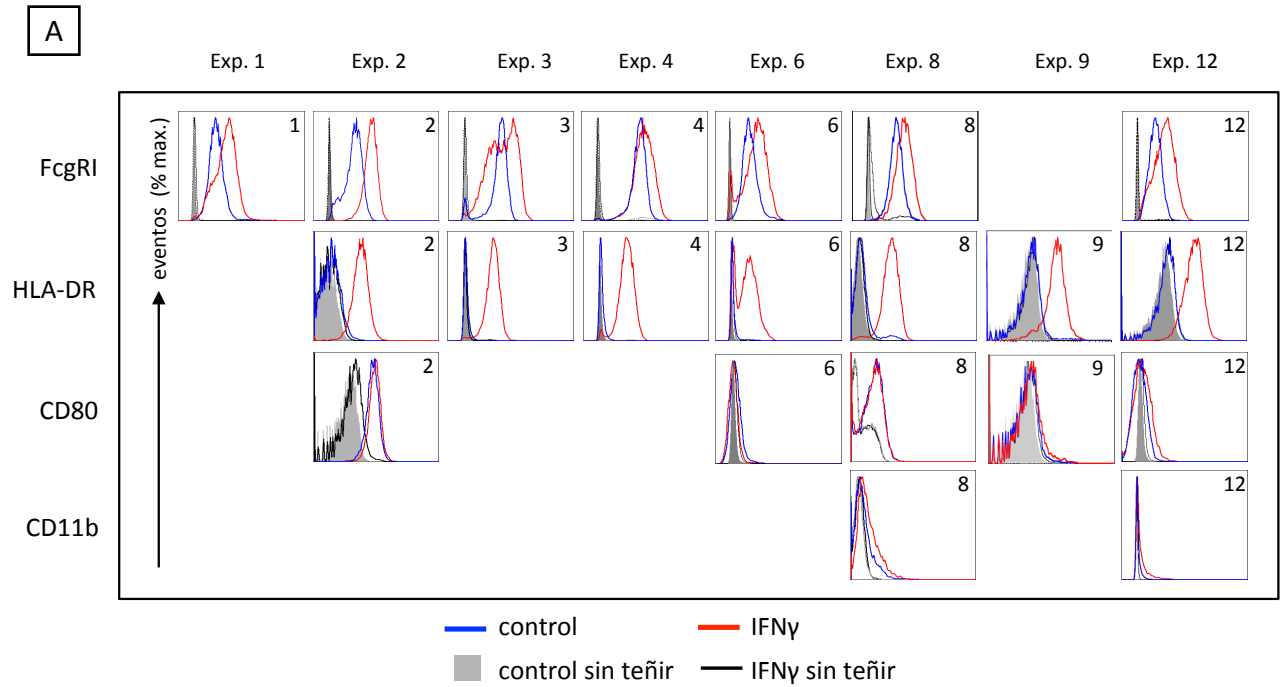


Figura 14. Expresión de FcγRI, HLA-DR y CD80 en THP-1 con o sin IFNγ.

A) Se muestran histogramas de fluorescencia de experimentos independientes para detectar nivel de expresión de FcγRI (tinción indirecta: 32.2, g a-m-FITC), HLA-DR-PE o CD80-APC

■ y — ; cultivos sin teñir, control e IFNγ, respectivamente.

— Tinción de THP control y — con IFNγ.

Se identifica el número de experimento en cada columna y en la parte superior derecha de cada histograma.

B) Cambio relativo en la media geométrica de fluorescencia respecto al control, cuantificada en histogramas de A. Cultivos control (azul), y tratados con IFNγ (rojo). Se indica la desviación estándar de las muestras con tratamiento.

### 3. Establecimiento de modelo en línea celular THP-1

#### 3.1 Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos de la línea celular THP-1

##### 3.1.2 Capacidad fagocítica

La capacidad fagocítica de monocitos THP-1, mediada por receptores para inmunoglobulinas G (Fc $\gamma$ Rs) fue determinada como se menciona en métodos y la [Figura 6](#).

En los experimentos 2 al 4, se observó una mayor fluorescencia (interpretado como una mayor cantidad de GRs internalizados) asociada a células que fueron cultivadas 48 hrs con 30 ng/mL de IFN $\gamma$  ([Figura 15A y B](#)). El porcentaje de fagocitos capaces de internalizar Grs es similar al de cultivos control, por lo que el índice fagocítico aumenta principalmente por la cantidad de eritrocitos ingeridos por los monocitos. También se observó un incremento del índice fagocítico utilizando GRs no opsonizados (datos no mostrados).

El incremento de la capacidad fagocítica bajo el efecto del IFN $\gamma$  es un fenómeno contrario a lo observado en el trabajo previamente realizado en el que se detectó que los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, tratados por el mismo tiempo y con la misma concentración de IFN $\gamma$ , fagocitan menos GRs ([Figura 4A y 7A](#)).

Como se mencionó anteriormente, en los monocitos THP-1 tratados con IFN $\gamma$ , aumenta la expresión del receptor Fc $\gamma$ RI, uno de los receptores activadores del proceso fagocítico a los que se unen los anticuerpos IgG unidos a los eritrocitos opsonizados. El incremento de fagocitosis pudiera estar relacionado, al menos parcialmente, a este aumento en los receptores. Sin embargo, el aumento de expresión de Fc $\gamma$ RI ocurre también en macrófagos derivados de monocitos y, como se describe más adelante, en THP-1 diferenciados a macrófagos (donde ocurre una disminución de la capacidad fagocítica). Esto, aunado al hecho de que la fagocitosis aumenta también con GRs no opsonizados, sugiere que el fenómeno no es producido por los cambios en la expresión del receptor Fc $\gamma$ RI.

Por otra parte, en experimentos posteriores (del experimento 9 en adelante) se observó un cambio en el efecto del IFN $\gamma$  sobre la capacidad fagocítica, observándose un efecto negativo. En los cultivos empleados para estos experimentos, la morfología de las células es estándar así como los cambios en marcadores celulares anteriormente descritos (véase No. de experimento en fagocitosis y en expresión de marcadores). El cambio en el efecto sobre la capacidad fagocítica coincide con el establecimiento de un nuevo cultivo a partir de células crioconservadas en nitrógeno líquido. Esto sugiere que el efecto del IFN $\gamma$  depende de condiciones particulares a las que están expuestas los cultivos o a la antigüedad de los mismos.

Además de cuantificar la capacidad fagocítica en este tipo celular, se evaluó si este fenómeno se pudiera asociar a un nivel distinto en la cantidad de F-actina luego del tratamiento con IFN $\gamma$ , como se describe a continuación.

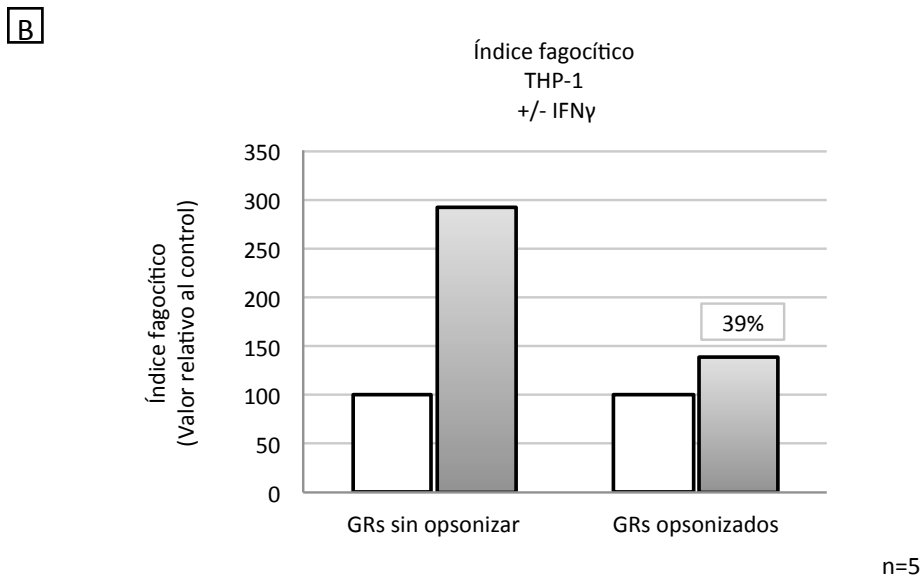
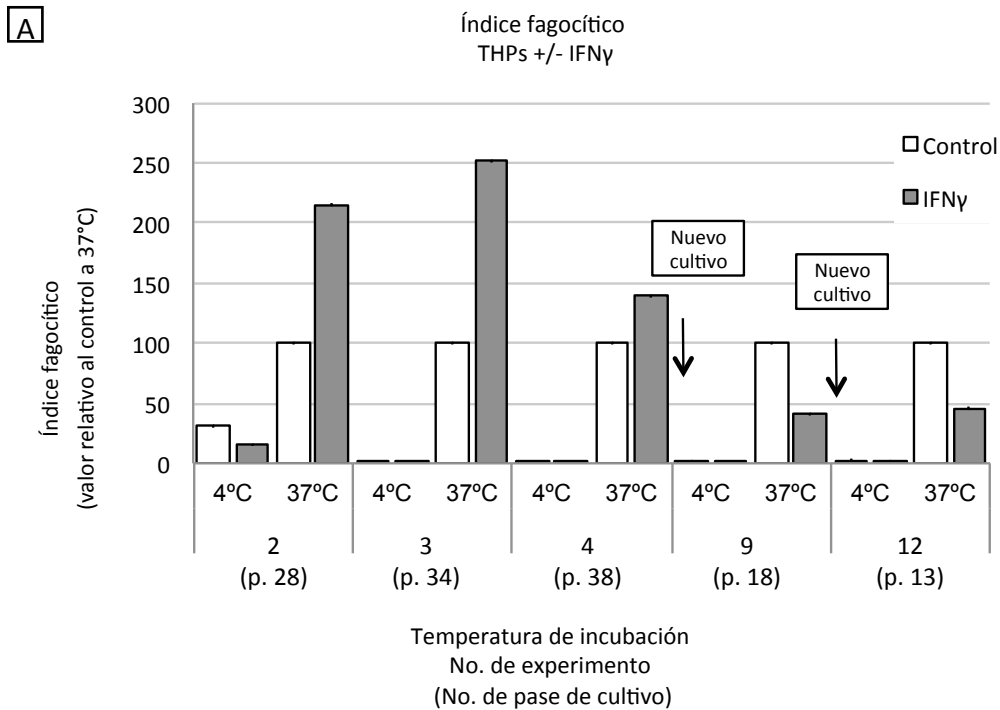


Figura 15. Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero por células THP-1, tratadas o no con IFN $\gamma$ . A) Índice fagocítico, normalizado respecto a muestras sin citocina a 37°C, de 5 experimentos independientes. Muestras incubadas a 4 y 37°C con GRs opsonizados. Se indica en el eje X la temperatura de incubación, el número de experimento y el número de pase del cultivo utilizado para dicho experimento. B) Valor promedio de experimentos a 37°C con GRs opsonizados y sin opsonizar.

### 3. Establecimiento de modelo en línea celular THP-1

#### 3.1 Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos de la línea celular THP-1

##### 3.1.3 Contenido de F-actina

Se cuantificó la cantidad de F-actina basal en cultivos de células THP-1 con la toxina fluorescente NBD-falacidina. En la [Figura 16A](#) se muestra el cambio relativo de fluorescencia en células positivas para NBD-falacidina. A la concentración óptima de células en los cultivos, concentración a la cual se realizaron los experimentos de expresión de marcadores y fagocitosis, la cantidad de F-actina en células con IFN $\gamma$  no es distinta a la de células control.

Es posible que el efecto que el IFN $\gamma$  ejerce sobre el citoesqueleto de macrófagos derivados de monocitos exista también en monocitos THP-1, pero ocurriendo con un curso temporal diferente. Para evaluar esta posibilidad, y para establecer los tiempos de tratamiento necesarios para que el tratamiento con IFN $\gamma$  indujese cambios en los porcentajes de F y G actina, se determinó la cantidad de F-actina a distintos tiempos de incubación con la misma concentración de IFN $\gamma$ . Se hizo una determinación de F-actina en condiciones basales en cultivos de THP-1 con o sin 30 ng/mL de IFN $\gamma$ , desde los 30 min hasta 48 horas.

La cantidad de actina basal en cultivos tratados con IFN $\gamma$  es mayor que en aquellos sin IFN $\gamma$ , a todos los tiempos medidos ([Figura 16B](#), experimento "A"). En otro experimento independiente, sin embargo, la cantidad de actina basal fue mayor en cultivos con IFN $\gamma$  únicamente en tres de los seis tiempos medidos ([Figura 16B](#), experimento "B"). La cantidad de F-actina basal en un mismo cultivo, no varía a través del tiempo. Es necesario realizar más experimentos para determinar si existe un efecto constante.

Para verificar el funcionamiento del método de tinción con un control positivo, así como la capacidad de responder ante un estímulo polimerizante, la cantidad de F-actina fue determinada después de una incubación con CCL5 en los experimentos descritos.

Previamente, se establecieron condiciones óptimas, tanto de concentración como de tiempo de incubación con la quimiocina para este tipo celular. Como se observa en la [Figura 16C](#), en todos los tiempos medidos, bajo los dos tratamientos y en los dos experimentos independientes, la incubación por 10 segundos con CCL5 50 ng/mL, resulta en un aumento promedio de 1.73 veces de la cantidad de F-actina.

Los niveles detectados de F-actina en células tratadas con IFN $\gamma$  es menor que los niveles en células no tratadas en cuatro de los seis tiempos registrados en el experimento A ([Figura 16C "A"](#)) y en tres de

los 5 tiempos medidos en el otro experimento (Figura 16C "B"). Estos resultados sugieren que los cambios en la capacidad fagocítica producidos por IFN $\gamma$  en monocitos THP-1 no necesariamente están relacionados a la cantidad de F-actina disponible en dicho momento. También se puede afirmar que el método de cuantificación de F-actina con NBD-falacidina es efectivo para cuantificar los cambios rápidos del contenido de F-actina tras estímulos como la quimiocina CCL5.

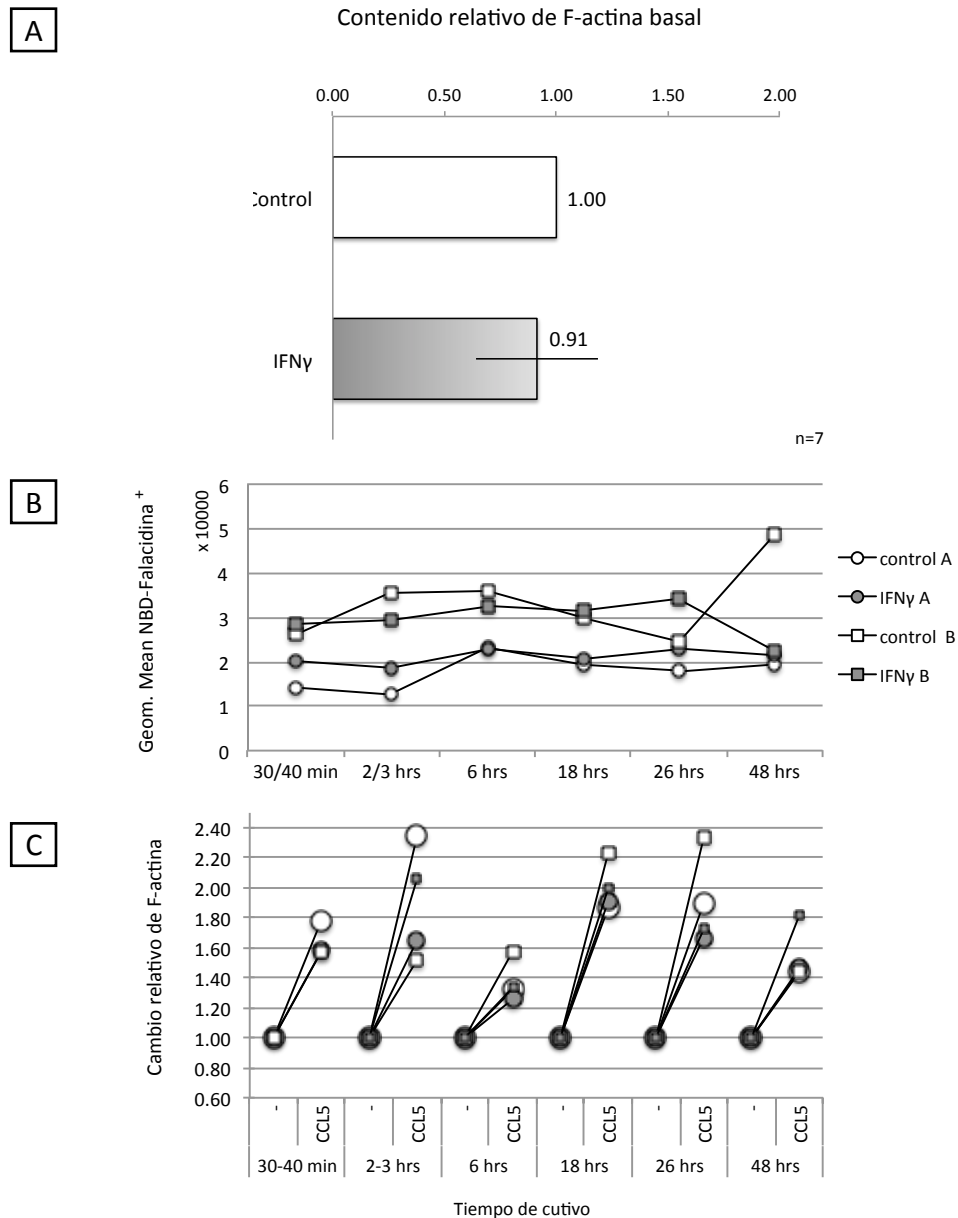


Figura 16 Cuantificación de F-actina en cultivos de monocitos THP-1 con o sin IFN $\gamma$ .

A) Tinción de cultivos THP-1 [ $2.5 \times 10^6$  cel/mL] con NBD-falacidina detectada por citometría de flujo. Cambio relativo de media geométrica en la población NBD-falacidina<sup>+</sup>.

B) Determinación de F-actina lo largo del tiempo. Células control (símbolos vacíos) e IFN $\gamma$  (símbolos grises) cultivadas por los tiempos indicados. Dos experimentos independientes: A (círculos) y B (cuadrados). Media geométrica de fluorescencia de cultivos en condiciones basales.

C) Determinación, en los mismos experimentos, de F-actina con un estímulo polimerizante (CCL5, 10 seg., 50 ng/mL). Cambio relativo de media geométrica de fluorescencia de NBD-falacidina en células positivas.

### 3. Establecimiento de modelo en línea celular THP-1

#### 3.2 Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos de la línea celular THP-1 diferenciados con PMA

##### 3.2.1 Marcadores de membrana

Debido a que en los primeros experimentos los efectos de IFN $\gamma$  sobre la fagocitosis y el contenido de F-actina observados en monocitos THP-1 son opuestos a los observados en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, se quiso explorar si el efecto de la citocina está relacionado con el estado de diferenciación de monocitos a macrófagos.

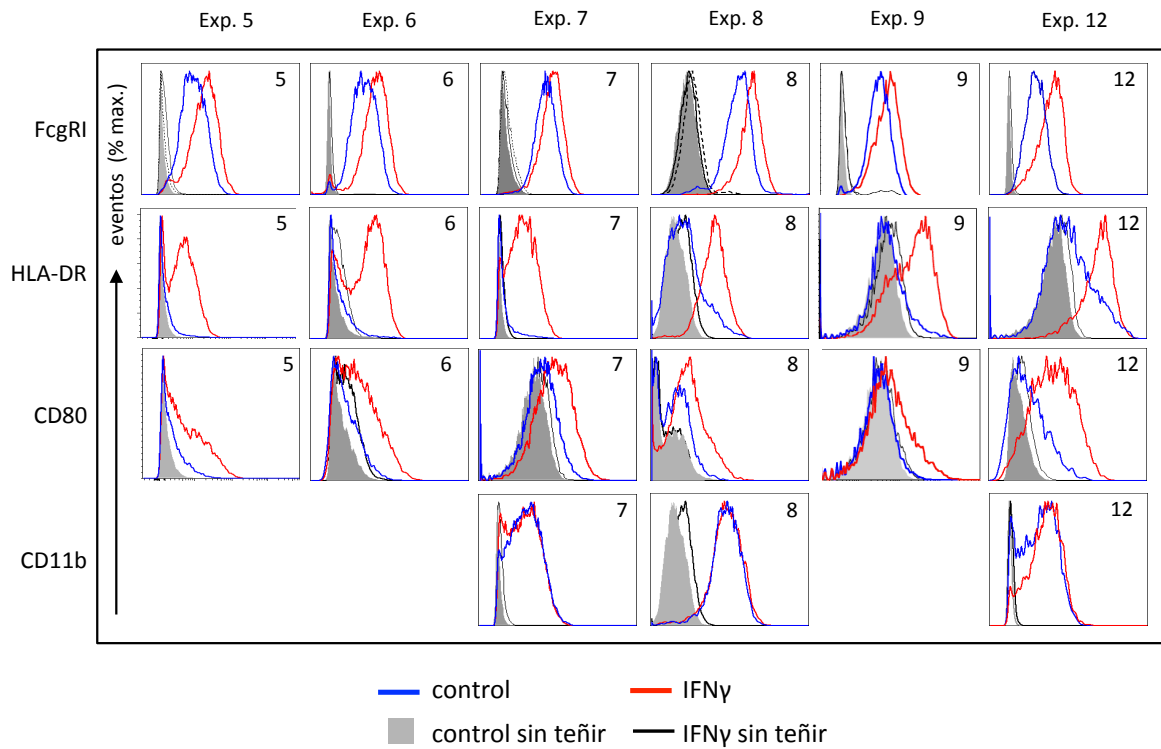
Los monocitos THP-1 fueron diferenciados con PMA de acuerdo a condiciones previamente estandarizadas en el laboratorio. Una forma de monitorear la actividad tanto de IFN $\gamma$  como de PMA, es midiendo la expresión de marcadores de membrana celular. Para determinar los cambios fenotípicos inducidos por el tratamiento con PMA y el posterior tratamiento con IFN $\gamma$ , se determinó por citometría de flujo la expresión de los marcadores Fc $\gamma$ RI, HLA-DR, CD80 y CD11b.

De acuerdo a lo esperado, IFN $\gamma$  aumenta la expresión de Fc $\gamma$ RI (Figura 17A, primer panel y 17B). Al comparar en un mismo experimento el aumento de expresión de este receptor en THP-1 o THP diferenciadas (denominadas en adelante THP-PMA), se observa un aumento continuo de la expresión entre las muestras: THP, THP con IFN $\gamma$ , THP-PMA y THP-PMA con IFN $\gamma$  (datos no mostrados). Por ello, se concluye que tanto el PMA como IFN $\gamma$  son capaces de aumentar la expresión de Fc $\gamma$ RI.

Al igual que con cultivos sin PMA, sólo las células con INF- $\gamma$  expresan HLA-DR, aunque no ocurre en toda la población (Figura 17A, 2do panel y 17B). Cuando se compara en el mismo experimento la expresión de este marcador en THP sin PMA, se comprobó que el INF- $\gamma$ , de manera independiente, induce la expresión de HLA-DR (datos no mostrados).

Con el anticuerpo anti CD80 se obtienen tinciones de muy baja intensidad de fluorescencia. Sin embargo, es posible notar que sólo en cultivos tanto diferenciadas con PMA, como tratados con IFN $\gamma$ , se induce la expresión de esta molécula (Figura 17A, 3er panel y 17B). Además, se comenzó a utilizar el marcador CD11b, el cual se sabe que en la línea celular THP-1, sólo se expresa al diferenciar las células. Estas observaciones permiten definir un perfil de expresión de marcadores de membrana que refleja la actividad de PMA como agente inductor de diferenciación e IFN $\gamma$  como activador.

**A**



**B**

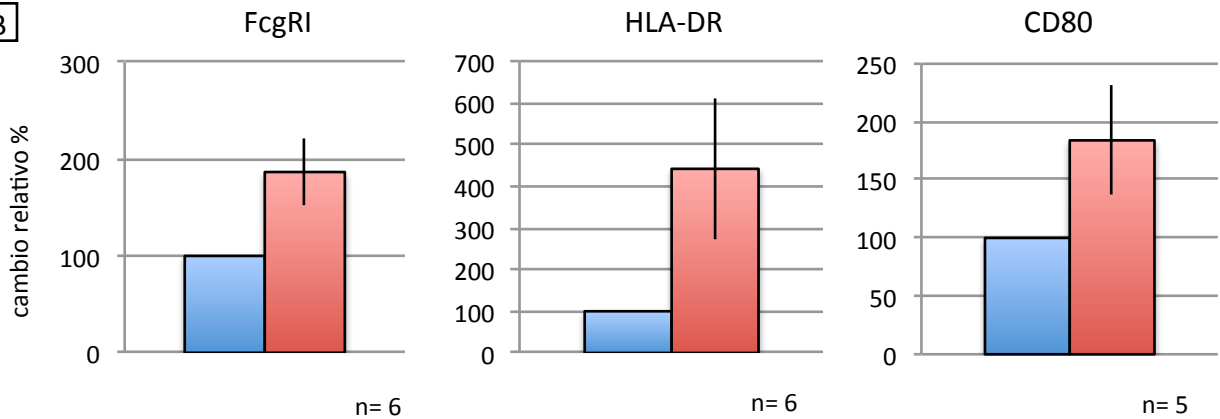


Figura 17. Expresión de FcγRI, HLA-DR, CD80 y CD11b en THP-1 -PMA con o sin IFNγ.

Se muestran histogramas de fluorescencia de experimentos independientes para detectar nivel de expresión de FcγRI (tinción indirecta:32.2, g a-m-FITC), HLA-DR-PE, CD80-APC o CD11b-PE.

■ y —; cultivos sin teñir, sin y con IFNγ, respectivamente.

— Tinción de THP sin IFNγ (control) y — con IFNγ.

Se identifica el número de experimento en cada columna y en la parte superior derecha de cada histograma.

B) Cambio relativo en la media geométrica de fluorescencia respecto al control, cuantificada en histogramas de A. Cultivos control (azul), y tratados con IFNγ (rojo). Se indica la desviación estándar de las muestras con tratamiento.



### 3. Establecimiento de modelo en línea celular THP-1

#### 3.2 Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos de la línea celular THP-1 diferenciados con PMA

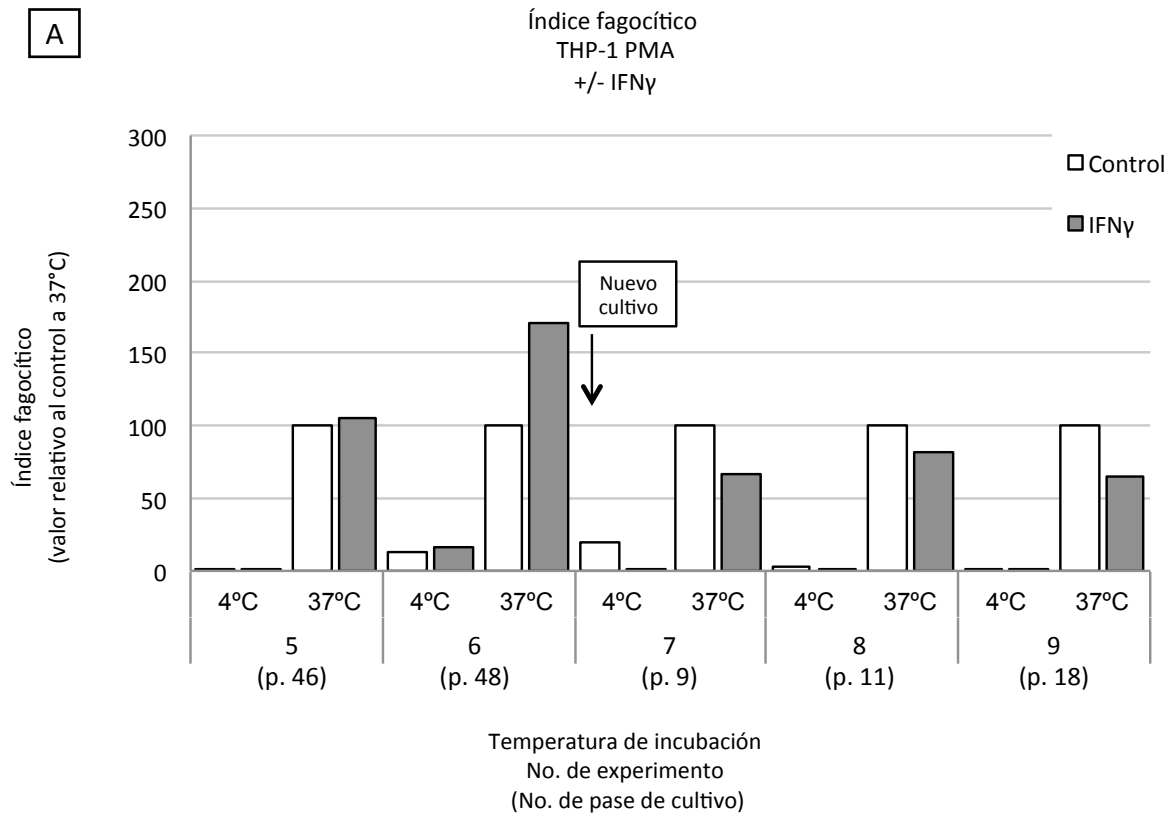
##### 3.2.2 Capacidad fagocítica

Una vez caracterizado el inmunofenotipo de cultivos THP-1, se realizaron también ensayos de fagocitosis con células diferenciadas. Resultados previos en el grupo de investigación muestran que en estas condiciones las células con IFN $\gamma$  tienen una menor capacidad fagocítica. Sin embargo, en los primeros dos experimentos realizados no se reprodujo dicha tendencia. Es posible que esto se debiera a una inadecuada diferenciación de las células con PMA. Uno de los factores que afecta la diferenciación de las células es la antigüedad del cultivo (tiempo de subcultivo) por lo que se repitieron los experimentos con un cultivo de células recién descongeladas. En estos experimentos sí se detecta una disminución del índice fagocítico en THP-1-PMA + IFN $\gamma$  (Figura 18A).

Por otra parte, se hicieron tinciones de marcadores de las células fagocíticas con la intención de distinguir a la población de células adecuadamente diferenciadas con PMA y polarizadas con IFN $\gamma$ , para analizar únicamente dicha población (según expresión de marcadores descrita anteriormente). Aunque la molécula HLA-DR se induce únicamente en cultivos con IFN $\gamma$ , al analizar la población HLA-DR positiva del experimento 6, por ejemplo, no se observaron cambios en el índice fagocítico obtenido. Cabe mencionar que únicamente la población HLA-DR positiva es capaz de fagocitar GRs (datos no mostrados). En otro experimento (No. 8), se hizo una tinción para detectar células CD11b positivas, sin que se alterara el índice fagocítico obtenido. Los resultados obtenidos sugieren, al igual que con cultivos THP-1, IFN $\gamma$  afecta a las células THP-1-PMA de una manera predecible en cuanto a marcadores de membrana.

No obstante, la variabilidad de resultados impide concluir que el IFN $\gamma$  tenga un efecto sobre la capacidad fagocítica. Quizá el proceso fagocítico sea sensible a otros factores, como la actividad de PMA o sensibilidad del cultivo respecto al tiempo de subcultivo.

A



B

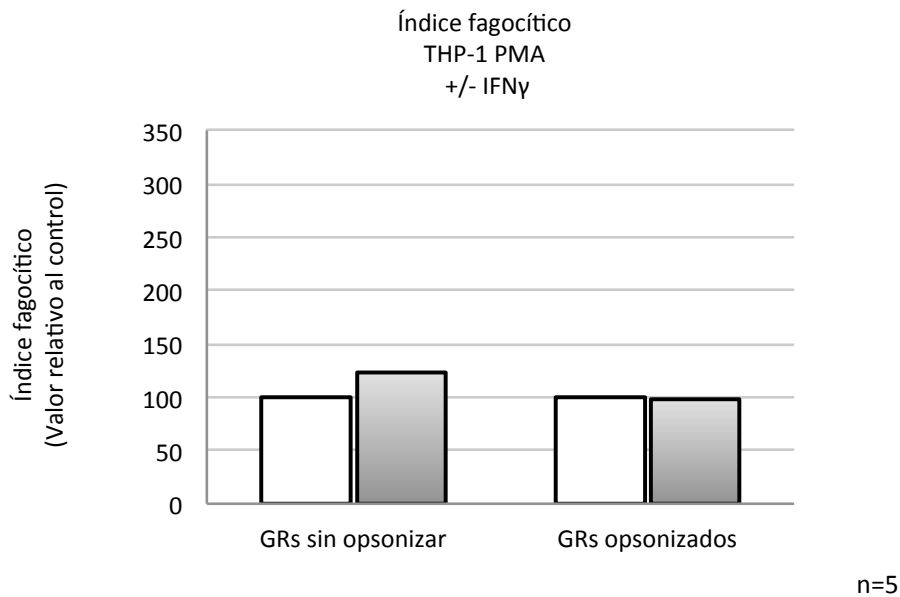


Figura 18. Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero por THP-1 diferenciadas con PMA. Cultivos con o sin IFN $\gamma$ .

A) Índice fagocítico, normalizado respecto a muestras sin citocina a 37°C, de 5 experimentos independientes. Muestras incubadas a 4 y 37°C con GRs opsonizados. Se indica la temperatura de incubación, el número de experimentos y el número de pase del cultivo utilizado para dicho experimento.

B) Valor promedio de experimentos a 37°C con GRs opsonizados y sin opsonizar.

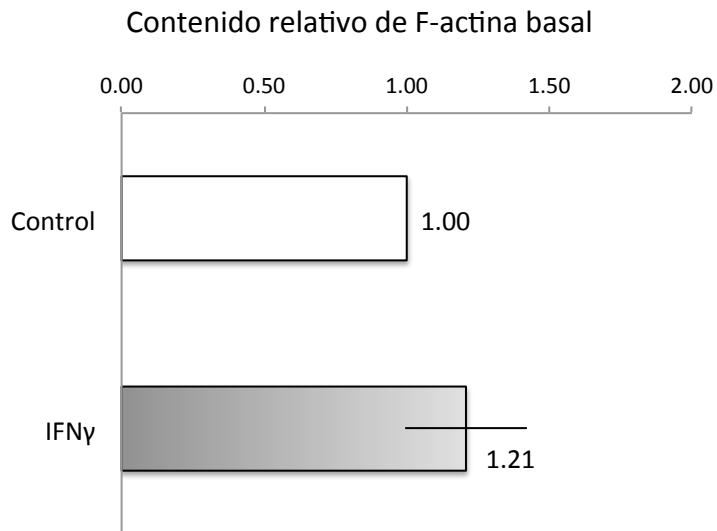
### 3. Establecimiento de modelo en línea celular THP-1

#### 3.2 Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos de la línea celular THP-1 diferenciados con PMA

##### 3.2.3 Contenido de F-actina

Al igual que con los otros tipos celulares, se cuantificaron los niveles de F-actina basal en cultivos THP-1 diferenciados con PMA, y el efecto del IFN $\gamma$  sobre éstos niveles. En la [Figura 19](#) se muestra el cambio relativo de fluorescencia en células positivas para NBD-falacidina. Existe un ligero aumento en la cantidad relativa de F-actina respecto a células sin IFN $\gamma$ . Sin embargo, no se obtuvo significancia estadística. Al evaluar la cantidad de F-actina de experimentos en los que parece haber una adecuada diferenciación de las células (experimentos No.7-9), el valor de F-actina relativa se acerca más a aquel de muestras control.

Lo anterior indica que en las células THP-1-PMA, el tratamiento con IFN $\gamma$  tiene un efecto distinto sobre los tres procesos hasta ahora estudiados. Por un lado, existe un claro patrón de cambio observado en la expresión de marcadores y la morfología celular. En el caso de la capacidad fagocítica, la tendencia es que disminuya después de la incubación con IFN $\gamma$ , aunque los resultados son sensibles a otros factores que pudieran ser la antigüedad del cultivo o los compuestos utilizados. Finalmente, la cantidad de F-actina detectada en los cultivos no se modifica significativamente (aunque la tendencia es a aumentar), como en el caso de THP-1 no diferenciados, tras el tratamiento IFN $\gamma$ .



n= 7

Figura 19. Cuantificación de F-actina en cultivos de monocitos THP-1 diferenciados con PMA, con o sin IFN $\gamma$ .

Tinción de cultivos THP-1 PMA [ $5 \times 10^6$  cel/mL] con NBD-falacidina detectada por citometría de flujo. Cambio relativo de media geométrica en la población NBD-falacidina<sup>+</sup>. Promedio de siete experimentos independientes y desviación estándar indicada.

## 4. Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos aislados de sangre periférica

### 4.1 Marcadores de membrana

Dados los resultados hasta ahora reportados, pareciera que el efecto del IFN $\gamma$  sobre macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (M $\phi$ ) es distinto al de macrófagos derivados de monocitos THP-1 y que estos a su vez, responden de manera distinta a monocitos THP-1 no diferenciados. Por este motivo, se quiso estudiar también el efecto en monocitos de sangre periférica, sin someterlos al cultivo de diferenciación a macrófagos.

Para determinar cómo se expresan las moléculas estudiadas en los otros tipos celulares, se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos anti Fc $\gamma$ RI, HLA-DR, CD80, CD11b y CD14. La tinción de CD14 se utilizó como criterio de pureza de células mononucleares después de la purificación.

Se obtuvieron los monocitos de sangre periférica de tres donadores sanos, de acuerdo a lo descrito en métodos. En la [Figura 20](#), se aprecia que la expresión del receptor Fc $\gamma$ RI, en condiciones normales (control) varía según el individuo. Como ocurre en M $\phi$ , el tratamiento con IFN $\gamma$  provoca un importante aumento en la expresión de éste receptor.

A diferencia de lo observado en la línea celular, los monocitos (y M $\phi$  también) expresan la molécula de presentación antigénica, HLA-DR en cultivos sin tratamiento. Sin embargo, su expresión no aumenta una vez cultivados con IFN $\gamma$ .

Por otra parte, los monocitos de sangre periférica expresan, y en grandes cantidades, la molécula CD80 luego del tratamiento con IFN $\gamma$  ([Figura 20](#)). En el caso de la línea celular, únicamente los cultivos diferenciados con PMA y activados con IFN $\gamma$  expresan CD80 y de manera mucho menor a lo observado en estos experimentos.

La incubación con IFN $\gamma$  no altera notoriamente la expresión de CD11b, aunque sería de utilidad la comparación de esta tinción con monocitos diferenciados a macrófagos.

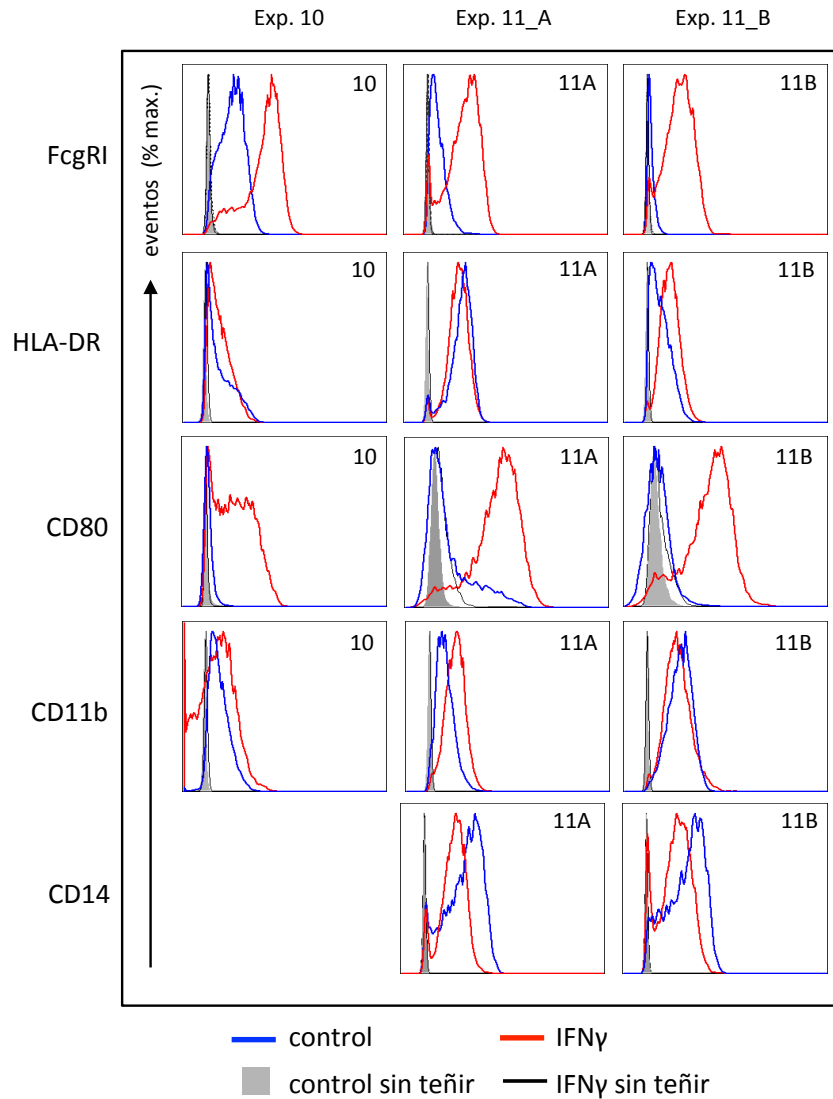


Figura 20. Expresión de Fc $\gamma$ RI, HLA-DR, CD80, CD11b y CD14 en monocitos aislados de sangre periférica.

Se muestran histogramas de fluorescencia de experimentos independientes para detectar nivel de expresión de Fc $\gamma$ RI (tinción indirecta: 32.2, g a-m-FITC), y demás marcadores con tinciones directas.

■ y — ; cultivos sin teñir, sin y con INF- $\gamma$ , respectivamente.

— Tinción de THP sin IFN $\gamma$  (control) y — con IFN $\gamma$ .

Se identifica el número de experimento en cada columna y en la parte superior derecha de cada histograma.

#### 4. Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos aislados de sangre periférica

##### 4.2 Capacidad fagocítica

La capacidad fagocítica de fue determinada para los monocitos de sangre periférica de los tres donadores. Como se muestra en la [Figura 21](#), en las células tratadas con IFN $\gamma$  el índice fagocítico es mucho menor, se reduce en promedio 80% en comparación a cultivos control. La disminución ocurre también durante fagocitosis no específica, utilizando GRs no opsonizados ([Figura 21B](#)) De los tipos celulares hasta ahora investigados, estas células son las de mayor sensibilidad ante la incubación con la misma concentración de IFN $\gamma$ . En este sentido, es importante determinar si la cantidad de receptores de IFN $\gamma$  es similar entre los tipos celulares, ya que esto podría ser uno de los motivos de la diferente sensibilidad y efecto del IFN $\gamma$ .

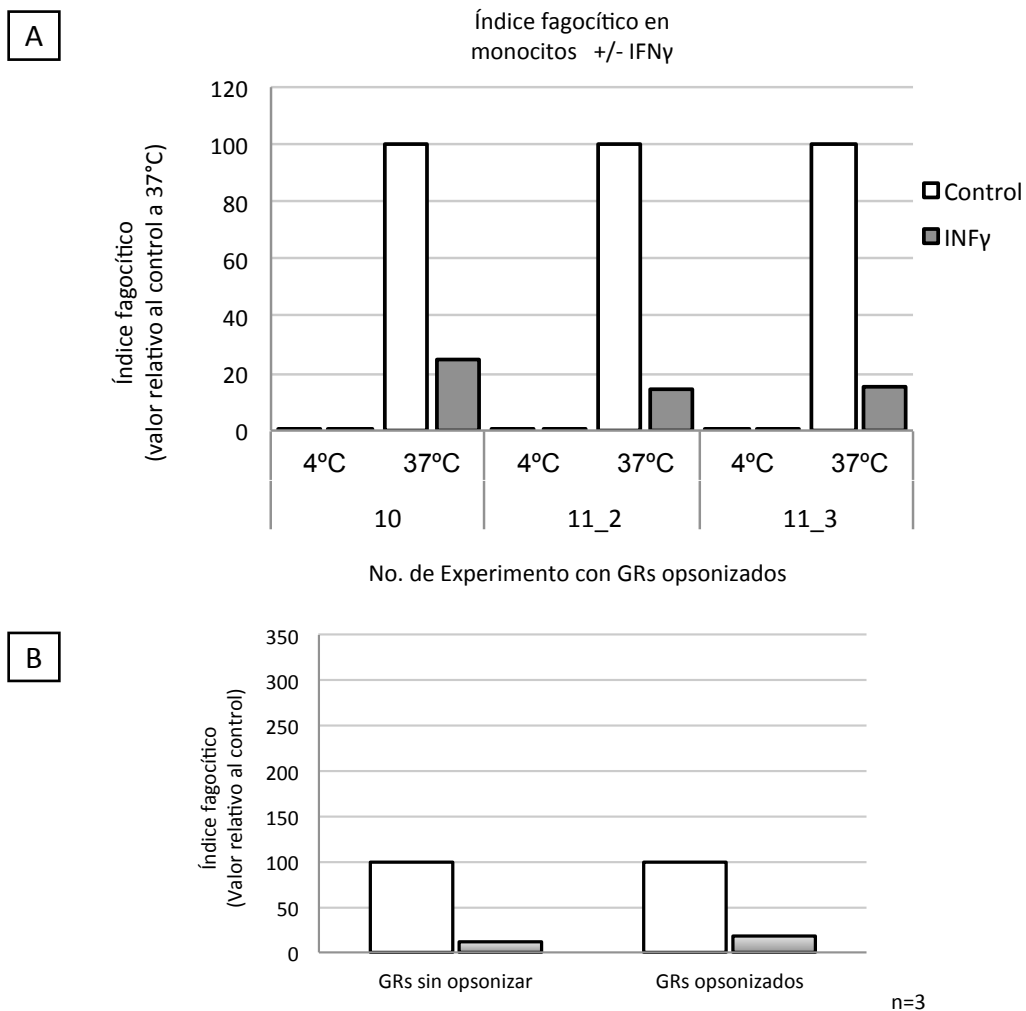


Figura 21. Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero por monocitos de sangre periférica. Cultivos con o sin IFN $\gamma$ . A) Índice fagocítico, normalizado respecto a muestras sin citocina, de 3 donadores. Muestras incubadas a 37°C con GRs opsonizados. B) Valor promedio de experimentos a 37°C con GRs opsonizados y sin opsonizar.

#### 4. Efecto del tratamiento con IFN $\gamma$ en monocitos aislados de sangre periférica

##### 4.3 Contenido de F-actina

Por último, se cuantificó la cantidad de F-actina en condiciones basales de los cultivos de monocitos de sangre periférica.

El contenido relativo de F-actina de células con IFN $\gamma$  respecto a los tres cultivos control es menor, como se aprecia en la [Figura 22](#). Podría evaluarse este efecto en más donadores para averiguar si el fenómeno tiene significancia estadística.

A pesar de que en los cultivos primarios el efecto del IFN $\gamma$  sobre la capacidad fagocítica es el mismo, en macrófagos derivados de monocitos el contenido de F-actina es mayor, mientras que en monocitos no diferenciados es menor.

Estos resultados, junto con los descritos para la línea celular THP-1 diferenciadas o no con PMA y sus respectivos efectos sobre la fagocitosis, indican que el contenido de F-actina, medido a 48 horas de cultivo mediante esta metodología parece ser un fenómeno independiente a la habilidad de las células para fagocitar partículas.

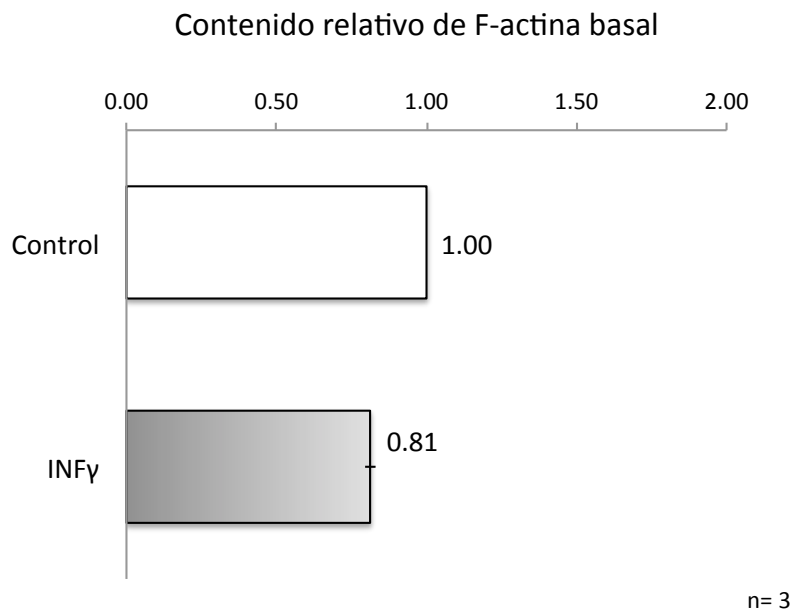


Figura 22. Cuantificación de F-actina en cultivos de monocitos de sangre periférica con o sin IFN $\gamma$ . Tinción con NBD-falacidina detectada por citometría de flujo. Cambio relativo de media geométrica en la población NBD-falacidina<sup>+</sup>.



## Discusión

En el presente trabajo se determinó la capacidad fagocítica, mediada por FcγRs, de monocitos THP-1, macrófagos THP-1, monocitos de sangre periférica y macrófagos derivados de monocitos. En todos los modelos evaluados, la incubación con 30 ng/mL de IFNγ por 48 horas modificó la capacidad de las células para fagocitar glóbulos rojos de carnero (GRs) opsonizados. En los cultivos primarios se determinó una importante disminución de la capacidad fagocítica, tanto en monocitos (disminución del índice fagocítico del 80%), como en macrófagos (48%) tratados con IFNγ.

El fenómeno de disminución de la fagocitosis tras el tratamiento con IFNγ ha sido reportado por autores como Schlesinger<sup>43</sup>, Speert<sup>44</sup> y Capsoni<sup>45</sup>, además del trabajo antecedente a este proyecto<sup>46</sup>. En él, se describe un análisis de los eventos de señalización tempranos producidos por el entrecruzamiento de receptores para IgGs, sin encontrar cambios significativos tras el tratamiento con IFNγ. Además, las células muestran una disminución de la capacidad fagocítica en general y no solo de la fagocitosis mediada por receptores FcγRs. Por otra parte, se encontró que la GTPasa Rac1 tiene un nivel mayor de activación basal (inferido por niveles mayores de Rac1 unida a GTP). La GTPasa Rac1 tiene un papel importante en la remodelación del citoesqueleto de actina necesaria para la formación de la copa fagocítica. En la regulación espacio-temporal de la copa fagocítica ésta proteína se presenta de manera activa desde el inicio de formación de la copa hasta el cierre de la misma, antes de la separación de la membrana para formar el fagosoma<sup>41</sup>. El nivel de activación basal distinto de esta GTPasa sugiere que el IFNγ podría modificar la dinámica de remodelación del citoesqueleto de actina.

Otros estudios apuntan hacia esa dirección también, pues se ha reportado que el IFNγ altera otros procesos dependientes del citoesqueleto. Trost y colaboradores investigaron los cambios en la composición proteica y el estado de fosforilación de componentes del fagosoma en macrófagos murinos activados con IFNγ<sup>58</sup>, mediante un análisis sistemático por espectrometría de masas. Encontraron alrededor de 2400 proteínas en los fagosomas, de las cuales un gran número se asocian con la maquinaria de citoesqueleto. Las tres isoformas de actina son más abundantes en los fagosomas de células tratadas (sin cambios en la cantidad de proteínas de unión a actina o factores de nucleación) después de cultivar a las células con IFNγ.

Hu <sup>47</sup> observó que monocitos humanos y macrófagos murinos pierden su capacidad migratoria, estimulada por CCL2, al ser tratados con IFN $\gamma$ . El fenómeno es dependiente de la sobreactivación de GTPasas y de la activación de STAT1. Este resultado sugiere que los cambios inducidos por el IFN $\gamma$  suceden a través de la vía canónica de JAK-STAT.

Hay además vías de acción del IFN $\gamma$  que podrían afectar el citoesqueleto de actina mediante elementos distintos a STAT1. La cinasa PI3K, por ejemplo, genera fosfolípidos como el fosfatidil inositol trifosfato, que se sabe está involucrado en procesos como la activación de factores intercambiadores de guanina (GEFs), señales efectoras de múltiples GTPasas y transmisión de señales a través de miosinas <sup>59</sup>. Se ha visto que cinasas JAK activadas por IFN $\gamma$  activan, por mecanismos no conocidos, a la subunidad catalítica de PI3K <sup>8</sup>. Cabe resaltar que en el proyecto antecedente del grupo de investigación, el inhibidor de PI3K LY294002 abatió los niveles mayores de F-actina basal en macrófagos activados IFN $\gamma$ .

La formación de estructuras basadas en filamentos de actina es regulada principalmente por elementos que modifican su polimerización (que de manera subordinada son; proteínas de unión a actina, factores de nucleación, factores promotores de nucleación y GTPasas). Previamente a la evaluación de elementos reguladores de la polimerización de actina, se quiso evaluar la cantidad de actina expresada en las células tratadas con IFN $\gamma$  respecto a cultivos sin la citocina, esperando descartar un cambio en la cantidad de F-actina basal dado por mayores cantidades de monómeros de actina disponibles para formar polímeros. Sin embargo, la actina es una de las proteínas más abundantes en la mayor parte de las células, representando hasta el 5 por ciento del peso seco de proteína total. Al evaluar la sensibilidad de la técnica de inmunodetección por Western blot, se concluyó que, en el rango de número de células utilizado, no se detectan cambios en la cantidad de actina total. Por ello, es poco probable que cambios de menor proporción en la expresión de las isoformas de actina se reflejaran en los métodos de cuantificación utilizados. Al determinar la actina total por citometría de flujo tampoco se hallaron diferencias entre tratamientos.

Los estudios descritos anteriormente sugieren que el citoesqueleto de actina, en particular la actina filamentosa (F-actina), se encuentra de alguna manera alterada bajo tratamientos con IFN $\gamma$  en macrófagos humanos y murinos. Los niveles mayores de F-actina forman parte de la hipótesis para explicar la mermada capacidad fagocítica de macrófagos.

Al realizar una cuantificación de F-actina mediante la tinción de NBD-falacidina, se observó que los monocitos de sangre periférica incubados con IFN- $\gamma$  tienen una menor cantidad de F-actina que los

cultivos incubados sin IFN $\gamma$  (Figura 22). Por el contrario, los macrófagos derivados de monocitos cultivados con IFN $\gamma$  tienen una mayor cantidad de actina que los cultivos control (Figura 4A y 7B). Si esta fuese la causa de una menor capacidad para fagocitar GRs, se esperaría observar efectos contrarios sobre la capacidad fagocítica entre los dos estados de diferenciación. Así mismo, la capacidad fagocítica observada en la línea celular THP-1 (como se detalla adelante) cambia ante el tratamiento con IFN $\gamma$ , mas no la cantidad de F-actina detectada (Figuras 16A y 19). Cabe mencionar que, debido al número de células utilizadas, los experimentos se hicieron sobre monocitos y macrófagos provenientes de distintos donadores en distintos experimentos. Sería relevante evaluar la capacidad fagocítica de células del mismo donador, antes y después de su diferenciación a macrófagos.

Es posible que la activación de la vía de IFN $\gamma$  incida sobre el citoesqueleto de actina y de manera indirecta sobre la capacidad de remodelar el citoesqueleto ante estímulos fagocíticos, pero que el fenómeno no haya podido ser detectado en nuestros experimentos de cuantificación de F-actina. Esto pudo deberse a distintos factores. Por un lado, la polimerización/despolimerización de actina es un proceso altamente dinámico; el equilibrio entre F- y G-actina es susceptible no sólo a estímulos fisiológicos sobre la membrana plasmática, sino también ante estímulos físicos como la temperatura, tiempos de incubación, medio de incubación, concentración de sales o ATP. Por ello, es posible que el método de cuantificación haya alterado el fenómeno a observar. La metodología de tinción de F-actina mediante NBD-falacidina ha sido utilizada para comparar cambios sobre un mismo cultivo bajo estímulos de corta duración (particularmente respuesta a quimiocinas o pequeños compuestos <sup>60, 61,62</sup>). En los experimentos realizados, sin embargo, se trató cultivos con tamaño, granularidad, propiedades adherentes y morfológicas distintas que pudiesen, por el tratamiento de despegado de las células de la superficie de cultivo, alterar al citoesqueleto previamente a su análisis.

Respecto al cultivo con IFN $\gamma$ , se han probado distintas concentraciones de IFN $\gamma$  en relación a cambios en el fenotipo de las células (Figura 4A). La concentración utilizada en los experimentos de este proyecto, de 1.7 nM, sugiere una concentración en un rango fisiológico plausible, dado que la constante de disociación para la unión de IFN $\gamma$  con su receptor se calcula en 0.15 nM (en la línea monocítica humana U-937 <sup>63</sup>).

Los experimentos en este proyecto se llevaron a cabo luego de 48 horas de incubación con IFN $\gamma$ . Resultados previos en el laboratorio muestran que en tiempos desde 12 horas de incubación con la citocina se detecta una disminución en la capacidad fagocítica.

Ya que modelos de activación de macrófagos con IFN $\gamma$  en ratón y humano se basan en cultivos estimulados por 1-4 días con la citocina <sup>25, 10, 11, 58</sup>, la función celular está mejor caracterizada a estos tiempos de cultivo. Este puede corresponder a un escenario de estimulación crónica por IFN $\gamma$  donde, tanto la infección por un patógeno seguida de la producción de IFN $\gamma$ - $\gamma$ , como el orden contrario de eventos, son posibles. Este es el caso de la infección crónica por *Mycobacterium tuberculosis*, donde IFN $\gamma$  juega un importante papel.

No obstante, se ha intentado caracterizar de manera temporal la respuesta al IFN $\gamma$ . En reportes como el de Wadell, se estudió la respuesta transcripcional al IFN $\gamma$  en ratones, desde 0.5 hasta 12 horas de cultivo. Al agrupar los genes sobrerregulados en este estudio se determinó que desde la primera hora se sobreexpresan genes involucrados en la presentación antigénica, así como genes de elementos de regulación negativa de la vía de IFN $\gamma$  <sup>11</sup>.

En este sentido, la determinación de capacidad fagocítica y cantidad de F-actina luego de 48 horas, representa un punto particular de observación de la respuesta inducida por IFN $\gamma$ - $\gamma$ . Dado que la remodelación del citoesqueleto es un proceso altamente dinámico, es posible que las alteraciones inducidas por esta citocina no se detecten al cuantificar la cantidad de F-actina en ese punto de la incubación.

Por otra parte, la activación de la vía de IFN $\gamma$  incide en muchas funciones efectoras, y el efecto de éstas pudiera, a tiempos largos de activación, afectar de manera indirecta los procesos evaluados de fagocitosis y polimerización de actina. Por ejemplo, el gen que codifica a la quimiocina CCL5 <sup>10</sup>(utilizada como control positivo de estímulos de polimerización en los experimentos) es regulado por la vía del IFN $\gamma$ , así que las células pudieran tener una mayor cantidad de actina basal debido al estímulo continuo de esta quimiocina. Así mismo, se ha descrito un fenómeno de tolerancia a citocinas pro-inflamatorias luego de una exposición continua a ellas. Esto puede promover la polarización hacia otro estado de activación que implique un cambio importante en el perfil transcripcional y funcional de las células <sup>64</sup>.

Pudiese haber además otro circuito de realimentación generado la inducción de F-actina. La polimerización de actina tiene un papel activo en la expresión génica, pues la actina globular es capaz de inducir una respuesta transcripcional mediante la liberación co-factores transcripcionales al unirse a un filamento <sup>65</sup>.

Aunque se puede considerar como respuesta a esta citocina sólo los eventos inmediatos en su señalización (es decir, el cambio definido de un número discreto de elementos o genes luego de un tiempo corto de estimulación) es importante también reconocer los efectos globales en la respuesta

de estas células mientras llevan a cabo funciones fisiológicamente relevantes, que comprenden también tiempos como los evaluados en este proyecto.

Los resultados obtenidos indican que en los cultivos primarios, tanto de monocitos como de macrófagos, la capacidad fagocítica de células con IFN $\gamma$  se encuentra notoriamente afectada (Figura 21 y 7A, respectivamente). Aunque esto parezca ser un fenómeno independiente a los experimentos de detección de F-actina, las evidencias arriba mencionadas sugieren que el citoesqueleto de actina juega un papel importante entre los efectos que el IFN $\gamma$  induce en estos tipos celulares. ¿Cómo se puede explicar este fenómeno en células en las que una función primordial es la eliminación de patógenos intracelulares y con una citocina conocida por promover la actividad microbicida de las mismas? Se han propuesto varias hipótesis al respecto.

El estudio de Trost y colaboradores sobre los fagosomas de macrófagos tratados con IFN $\gamma$  describe un retraso en la maduración de fagosomas (que consiste en la fusión secuencial del fagosoma con lisosomas y endosomas tardíos) por un recubrimiento mayor de los fagosomas con actina. Esto podría funcionar como un mecanismo para mejorar la degradación proteica y favorecer la generación de péptidos para ser destinados a la ruta de presentación de antígenos provenientes de esos fagosomas <sup>58</sup>.

Es posible también que el fenómeno observado en la capacidad fagocítica sea un evento o efecto secundario, consecuencia indirecta de la regulación de otro mecanismo efector. En este sentido, Hu *et. al.* proponen que las alteraciones de migración observados en macrófagos de ratón tratados con IFN $\gamma$  funcionan como un método para arrestar el tránsito de leucocitos una vez que han migrado al sitio de infección, permitiendo que se lleve a cabo la función efectora y pro-inflamatoria de los mismos <sup>47</sup>.

Es importante mencionar que las enzimas involucradas en el estallido respiratorio, un proceso fundamental para la eliminación de patógenos en fagosomas, juegan un papel importante en la activación de macrófagos. El IFN $\gamma$  es necesario no sólo para la sobre expresión de las subunidades de phox, sino para la reubicación de las mismas hacia la membrana plasmática <sup>66</sup>. Además, las enzimas iNOS y phox modulan la expresión de más de la mitad de los genes sobre expresados o reprimidos con IFN $\gamma$  <sup>10</sup>. Para producir superóxido, es necesaria la traslocación de las subunidades del complejo NADPH oxidasa a la membrana, incluyendo a las proteínas citosólicas phox y a la GTPasa Rac1. Hay además, una serie de evidencias que relacionan directamente la remodelación de actina con el ensamblaje y activación de phox <sup>49, 67,68,69</sup>.

Dado que IFN $\gamma$  incide en la capacidad microbicida mediante la modulación de iNOS y phox y la activación de estas depende de manera directa de proteínas reguladoras del citoesqueleto, es posible que los efectos observados en la capacidad fagocítica por alteración de la polimerización de actina, se relacionen con la posterior activación de phox.

Finalmente, existen procesos regulados por los mismos patógenos que infectan a células mieloides. Se sabe que micobacterias como *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium tuberculosis* inhiben la vía de IFN $\gamma$  interfiriendo en múltiples pasos de la señal de activación, como la presentación de antígenos<sup>70</sup> o la regulación transcripcional a nivel epigenético<sup>71</sup>. Así mismo, se conocen un gran número de toxinas bacterianas que alteran GTPasas del hospedero como mecanismo de evasión<sup>72</sup>, y de virus que secuestran el citoesqueleto de actina para el inicio, mantenimiento y diseminación de la infección<sup>73</sup>. Por todo ello, al evaluar las funciones celulares de linajes como el de monocitos y macrófagos, es importante recordar el papel de organismos patógenos en la evolución y regulación de procesos como el de reconocimiento, fagocitosis, estallido respiratorio y presentación antigénica. Dichos procesos están sujetos a una fuerte selección basada tanto en los mecanismos de defensa de las células inmunes, como en los mecanismos invasivos y evasores de patógenos.

Aunque se ha comparado la eficiencia fagocítica de subpoblaciones dentro de los monocitos humanos en circulación<sup>74</sup>, dicha capacidad entre monocitos de sangre periférica y macrófagos derivados de ellos no está bien caracterizada. Generalmente, se cree que los monocitos de circulación fagocitan menos que los macrófagos diferenciados a partir de ellos u otras poblaciones residentes de tejido, por ser un tipo celular en un estado más inmaduro que los macrófagos. Aunque los experimentos de fagocitosis no se realizaron con células provenientes del mismo donador, la fagocitosis en monocitos disminuye más en monocitos que en macrófagos derivados de monocitos (80 vs. 48% Figuras 21 y 7A, respectivamente), lo que concuerda con la idea de que la población de monocitos en circulación tiene capacidades diferentes de respuesta antes de infiltrarse a tejidos bajo condiciones inflamatorias, como la generada con IFN $\gamma$ . Esto también puede interpretarse como una menor capacidad de activación si las células no han pasado a un estado de maduración o diferenciación a un fenotipo de macrófago.

Los primeros ensayos realizados con monocitos THP-1, mostraron un efecto contrastante con lo observado en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (M $\phi$ ). Los monocitos THP-1 mostraron un notorio aumento en la cantidad de GRs internalizados luego de haber sido tratados con IFN $\gamma$  (Figura 15, experimentos 2,3 y 4). Este resultado podría deberse a las características de la línea celular, o quizá, al estado de diferenciación. Teniendo en cuenta las diferencias en la capacidad

fagocítica entre monocitos y macrófagos de cultivos primarios, se evaluó entonces la fagocitosis en monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos con PMA (compuesto activador de PKC). El modelo de diferenciación a macrófagos con PMA ha sido ampliamente utilizado, pues los monocitos adquieren características morfológicas y fenotípicas similares a M $\phi$ .<sup>75, 29</sup> . Se han descrito también diferencias transcripcionales de algunos genes entre estos dos modelos<sup>76</sup>. Los ensayos realizados con macrófagos THP-1 se realizaron cuando el cultivo de ésta línea tenía alrededor de tres meses de subcultivo. En los primeros experimentos de fagocitosis se obtuvieron resultados similares a los monocitos sin diferenciar. Es probable que esto se deba a una inadecuada diferenciación de las células, como se ha observado anteriormente en el laboratorio. Al utilizarse un cultivo fresco (por descongelación de alícuotas preservadas a -70°C), se observaron cambios en la morfología y proliferación de las células concordantes a un estado diferenciado a macrófagos. Con este cultivo se observó una disminución de la capacidad fagocítica (Figura 18A, experimentos 7 8 y 9). El efecto del IFN $\gamma$  sobre la capacidad fagocítica no varía en los experimentos realizados en cultivos primarios, sin embargo tanto en monocitos como macrófagos THP-1 hay una fuente de variación en los resultados obtenidos que puede estar relacionada al tiempo de sub cultivo de la línea celular.

Los marcadores de membrana evaluados por citometría de flujo se comportan de manera estable y predecible en los experimentos realizados: el receptor Fc $\gamma$ RI aumenta con el tratamiento de IFN $\gamma$ , tanto en monocitos como macrófagos THP-1 (Figura 14A,B y 17A,B). La molécula de presentación HLA-DR se induce fuertemente en monocitos y su expresión aumenta en macrófagos (Figura 14A,B y 17A,B). La molécula coactivadora CD80 no se expresa en monocitos y sólo se expresa en macrófagos tratados con IFN $\gamma$ . Otros marcadores de diferenciación comúnmente utilizados, como CD11b también muestran un patrón de expresión de acuerdo a lo esperado. Estos resultados indican que IFN $\gamma$  tiene actividad como citocina y esta se ve reflejada de manera reproducible sobre los marcadores celulares. Por otro lado, experimentos sobre los mismos cultivos realizados para llevar a los macrófagos a otros estados de activación muestran que son capaces de polarizarse bajo estímulos de IL-4 o IL-10. Esto sugiere que la citocina es funcional y el estado de diferenciación de macrófagos probablemente también. Si la sensibilidad cambia de manera particular con el estímulo de IFN $\gamma$ , quizá se deba a la recepción y activación de la vía. La determinación de expresión del receptor de IFN $\gamma$  en los cultivos sería de particular importancia para evaluar dicha posibilidad.

De acuerdo a los resultados de este proyecto, tanto los monocitos de sangre periférica como los macrófagos derivados de monocitos son profundamente afectados por el tratamiento por 48 horas

con IFN $\gamma$ . El IFN $\gamma$  también afecta a células monocíticas de la línea celular THP-1, pues monocitos y macrófagos THP-1 tienen una mayor menor capacidad fagocítica al ser estimulados con IFN $\gamma$ . Aunque los efectos en fagocitosis utilizando células THP-1 están sujetos a alteraciones aún por determinar, contando con respuestas distintas sobre la capacidad fagocítica en esta línea celular, es posible continuar investigando de qué manera el IFN $\gamma$  pudiera modular el citoesqueleto de actina.



## Conclusiones

En el presente proyecto se probaron métodos para la cuantificación de actina total y filamentosa en cultivos de células monocíticas tratadas con IFN $\gamma$  y se evaluó la línea celular THP-1 como modelo de estudio del cambio de F-actina y fagocitosis inducidas por el IFN $\gamma$ , tanto en monocitos como macrófagos diferenciados de monocitos.

El método utilizado de sedimentación diferencial no es el óptimo para separar las fracciones de actina globular y filamentosa en células monocíticas.

La cantidad de actina total, evaluada por inmunodetección en Western blot o citometría de flujo, no cambia bajo el tratamiento de IFN $\gamma$  (48 hrs, 30 ng/mL).

En monocitos THP-1, es posible monitorear actividad de la citocina con el aumento en la expresión de Fc $\gamma$ RI y HLA-DR:

- IFN $\gamma$  aumenta expresión de Fc $\gamma$ RI.
- IFN $\gamma$  induce expresión de HLA-DR.
- CD80 no se expresa en THP ya sea con o sin IFN $\gamma$ .

En monocitos THP-1 hay una tendencia en los cultivos tratados con IFN $\gamma$  a mostrar una menor capacidad fagocítica mediada por Fc $\gamma$ Rs. La cantidad de F-actina, a la concentración celular usada para experimentos de fagocitosis, no cambia en cultivos con IFN $\gamma$ .

Es posible monitorear la actividad de IFN $\gamma$  en macrófagos THP-1, diferenciados de monocitos con PMA, con el cambio en expresión de Fc $\gamma$ RI y HLA-DR y el efecto del PMA con el cambio de expresión en CD80:

- Tanto PMA como IFN $\gamma$  aumentan la expresión de Fc $\gamma$ RI.
- IFN $\gamma$  induce expresión de HLA-DR, PMA no.
- IFN $\gamma$  induce expresión de CD80 únicamente en cultivos THP previamente tratados con IFN $\gamma$ .
- CD11b se expresa sólo en cultivos con PMA, ya sea con o sin IFN $\gamma$ .

Aunque existe una tendencia, no es posible concluir que en cultivos de THP diferenciados con PMA el IFN $\gamma$  disminuye su capacidad fagocítica. La capacidad fagocítica de los cultivos THP-1 parece ser sensible al tiempo de subcultivo o antigüedad del IFN $\gamma$  utilizado. La cantidad de F-actina no aumenta de manera significativa en cultivos con IFN $\gamma$ .

El IFN $\gamma$  regula de manera negativa la capacidad fagocítica en monocitos de sangre periférica, al igual que en macrófagos derivados de monocitos.

El modelo de macrófagos THP-1, diferenciados con PMA de acuerdo a la expresión de marcadores y capacidad fagocítica parece ser similar al de macrófagos provenientes de cultivos primarios.

## Apéndice

Relación de figuras con número y etiqueta de experimentos

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>	<b>Experimentos</b>
Figura 6	Resultados característicos de un ensayo de fagocitosis.	36	A.46
Figura 7	Fagocitosis y F-actina en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica.	37	A.27, A.4
Figura 8	Estandarización de condiciones para inmuno detección de actina por Western blot.	39	A.11, A.12, A.13, A.14
Figura 9	Separación de F- y G-actina bajo distintas condiciones de polimerización.	42	A.25, A.26, A.27, A.29
Figura 10	Western blot anti-actina en extractos totales con o sin IFN $\gamma$ .	44	A.26, A.27, A.30, A.33, A.35, A.38, A.39
Figura 11	Western blot anti-actina de células THP. Curva de concentración celular en el lisado total.	44	A.41
Figura 12	Tinción intracelular anti-actina.	46	A.30
Figura 13	Tinción intracelular anti-actina en M $\phi$ y THP-1.	46	A.9.5, A.27, A.28, A.30, A.26, A.38, A.39
Figura 14	Expresión de Fc $\gamma$ RI, HLA-DR y CD80 en THP-1 con o sin INF- $\gamma$ .	48	A.42, A.45, A.46, A.48, A.51, A.56, A.58, A.61
Figura 15	Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero por THP-1, cultivados con o sin IFN $\gamma$ .	50	A.45, A.46, A.48, A.58, A.61
Figura 16	Cuantificación de F-actina en cultivos de monocitos THP-1 con o sin INF- $\gamma$ .	52	A.44, A.45, A.46, A.48, A.51, A.58, A.61, A.37, A.40
Figura 17	Expresión de Fc $\gamma$ RI, HLA-DR y CD80 en THP-1 -PMA con o sin INF- $\gamma$ .	54	A.50, A.51, A.54, A.56, A.58, A.61
Figura 18	Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero por THP-1 diferenciadas con PMA. Cultivos con o sin IFN $\gamma$ .	56	A.50, A.51, A.54, A.56, A.58
Figura 19	Cuantificación de F-actina en cultivos de monocitos THP-1 diferenciados con PMA, con o sin INF- $\gamma$ .	58	A.47, A.48, A.50, A.51, A.54, A.56, A.58, A.61
Figura 20	Expresión de Fc $\gamma$ RI, HLA-DR, CD80 y CD11b en monocitos de sangre periférica.	60	A.59, A.60
Figura 21	Fagocitosis de glóbulos rojos de carnero por monocitos de sangre periférica. Cultivos con o sin IFN $\gamma$ .	61	A.59, A.60
Figura 22	Cuantificación de F-actina en cultivos de monocitos de sangre periférica con o sin INF- $\gamma$ .	62	A.59, A.60

## Referencias Bibliográficas

- <sup>1</sup> Wheelock, E. F. Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science (New York, N.Y.)* **149**, 310–1 (1965).
- <sup>2</sup> Billiau, A. & Matthys, P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine & growth factor reviews* **20**, 97–113 (2009).
- <sup>3</sup> Alberts, B. *Molecular biology of the cell*. (Garland Science: New York, 2002).at <<http://www.worldcat.org/title/molecular-biology-of-the-cell/oclc/48122761>>
- <sup>4</sup> Lin F., Y. H. Interferon-Gamma. *Encyclopedia of Signaling Molecules: SpringerReference* (2012).doi: 10.1007/SpringerReference\_341736 2012-08-24 11:37:49 UTC
- <sup>5</sup> UniProt Kb P01579. at <<http://www.uniprot.org/uniprot/P01579>>.
- <sup>6</sup> Savan, R., Ravichandran, S., Collins, J. R., Sakai, M. & Young, H. a Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine & growth factor reviews* **20**, 115–24 (2009).
- <sup>7</sup> Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. & Hume, D. A. Interferon- $\gamma$  : an overview of signals , mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* **75**, (2004).
- <sup>8</sup> Plataniias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews. Immunology* **5**, 375–86 (2005).
- <sup>9</sup> Hu, X. & Ivashkiv, L. B. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity* **31**, 539–50 (2009).
- <sup>10</sup> Ehrt, S. *et al.* Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *The Journal of experimental medicine* **194**, 1123–40 (2001).
- <sup>11</sup> Waddell, S. J. *et al.* Dissecting interferon-induced transcriptional programs in human peripheral blood cells. *PloS one* **5**, e9753 (2010).
- <sup>12</sup> Zhang, S.-Y. *et al.* Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. *Immunological reviews* **226**, 29–40 (2008).
- <sup>13</sup> Mead, J. R. & You, X. Susceptibility differences to Cryptosporidium parvum infection in two strains of gamma interferon knockout mice. *The Journal of parasitology* **84**, 1045–8 (1998).
- <sup>14</sup> Murray, P. J., Young, R. A. & Daley, G. Q. Hematopoietic remodeling in interferon-gamma-deficient mice infected with mycobacteria. *Blood* **91**, 2914–24 (1998).
- <sup>15</sup> Matsumura, T. *et al.* Interferon- $\gamma$ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A Streptococcus infections. *Nature communications* **3**, 678 (2012).
- <sup>16</sup> Young Neal S., Stanton L. Gerson, K. A. H. *Clinical Hematology*. 1456 (Mosby: 2006), MD Consult página web. Disponible en <http://www.mdconsult.com>.

- <sup>17</sup> ACTIMMUNE® (Interferon gamma-1b) U.S. Prescribing Information, Prozar Corporation. at <<http://www.actimmune.com/img/pi.pdf>>.
- <sup>18</sup> A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. *The New England journal of medicine* **324**, 509–16 (1991).
- <sup>19</sup> Ahlin, A., Lärffars, G., Elinder, G., Palmblad, J. & Gyllenhammar, H. Gamma interferon treatment of patients with chronic granulomatous disease is associated with augmented production of nitric oxide by polymorphonuclear neutrophils. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **6**, 420–4 (1999).
- <sup>20</sup> Murray, P. J. & Wynn, T. a Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology* **11**, 723–37 (2011).
- <sup>21</sup> Zaidi, M. R. *et al.* Interferon- $\gamma$  links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. *Nature* **469**, 548–53 (2011).
- <sup>22</sup> Pollard, J. W. Trophic macrophages in development and disease. *Nature reviews. Immunology* **9**, 259–70 (2009).
- <sup>23</sup> Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **11**, 762–74 (2011).
- <sup>24</sup> Serbina, N. V, Jia, T., Hohl, T. M. & Pamer, E. G. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology* **26**, 421–52 (2008).
- <sup>25</sup> Ambarus, C. A. *et al.* Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *Journal of immunological methods* **375**, 196–206 (2012).
- <sup>26</sup> Pollard, J. W. Trophic macrophages in development and disease. *Nature reviews. Immunology* **9**, 259–70 (2009).
- <sup>27</sup> Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)* **336**, 86–90 (2012).
- <sup>28</sup> Hashimoto, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792–804 (2013).
- <sup>29</sup> Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B. & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one* **5**, e8668 (2010).
- <sup>30</sup> Mittar, D., Rosanto, P. & Catherine, M. *Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation*. 20 (2011).at <[http://www.bdbiosciences.com/documents/BD\\_Multicolor\\_MonocyteMacrophageDiff\\_AppNote.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_Multicolor_MonocyteMacrophageDiff_AppNote.pdf)>
- <sup>31</sup> Kohro, T. *et al.* A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **11**, 88–97 (2004).

- <sup>32</sup> Cassetta, L., Cassol, E. & Poli, G. Macrophage polarization in health and disease. *TheScientificWorldJournal* **11**, 2391–402 (2011).
- <sup>33</sup> Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* **8**, 958–69 (2008).
- <sup>34</sup> Campellone, K. G. & Welch, M. D. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 237–51 (2010).
- <sup>35</sup> Chhabra, E. S. & Higgs, H. N. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature cell biology* **9**, 1110–21 (2007).
- <sup>36</sup> Pollard, T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **36**, 451–77 (2007).
- <sup>37</sup> Tybulewicz, V. L. J. & Henderson, R. B. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nature reviews. Immunology* **9**, 630–44 (2009).
- <sup>38</sup> Park, H., Chan, M. M. & Iritani, B. M. Hem-1: Putting the “WAVE” into actin polymerization during an immune response. *FEBS letters* **584**, 4923–4932 (2010).
- <sup>39</sup> May, R. C. & Machesky, L. M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of cell science* **114**, 1061–77 (2001).
- <sup>40</sup> Gordon, S. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European journal of immunology* **38**, 3257–64 (2008).
- <sup>41</sup> Swanson, J. a Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 639–49 (2008).
- <sup>42</sup> Schoenborn, J. R. & Wilson, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology* **96**, 41–101 (2007).
- <sup>43</sup> Schlesinger, L. S. & Horwitz, M. A. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacte. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **147**, 1983–94 (1991).
- <sup>44</sup> Speert, D. P. & Thorson, L. Suppression by human recombinant gamma interferon of in vitro macrophage nonopsonic and opsonic phagocytosis and killing. *Infection and immunity* **59**, 1893–8 (1991).
- <sup>45</sup> Capsoni, F. *et al.* Fc receptors expression and function in mononuclear phagocytes from AIDS patients: modulation by IFN-gamma. *Scandinavian journal of immunology* **39**, 45–50 (1994).
- <sup>46</sup> Frausto-Del-Río, D. *et al.* Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells. *Cytokine* **57**, 158–68 (2012).
- <sup>47</sup> Hu, Y., Hu, X., Boumsell, L. & Ivashkiv, L. B. IFN-gamma and STAT1 arrest monocyte migration and modulate RAC/CDC42 pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 8057–65 (2008).

- <sup>48</sup> Barak, L. S., Yocum, R. R. & Webb, W. W. In vivo staining of cytoskeletal actin by autointernalization of nontoxic concentrations of nitrobenzoxadiazole-phalloidin. *The Journal of cell biology* **89**, 368–72 (1981).
- <sup>49</sup> Rasmussen, I. *et al.* Effects of F/G-actin ratio and actin turn-over rate on NADPH oxidase activity in microglia. *BMC immunology* **11**, 44 (2010).
- <sup>50</sup> Cytoskeleton, I. G-Actin/F-actin In Vivo Assay Biochem Kit. at <<http://www.cytoskeleton.com/bk037>>
- <sup>51</sup> Cano, M. L. Mechanisms responsible for F-actin stabilization after lysis of polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Cell Biology* **116**, 1123–1134 (1992).
- <sup>52</sup> Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B. & Vogel, J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* **30**, 1845–55 (2009).
- <sup>53</sup> Guyre, P. M., Morganelli, P. M. & Miller, R. Recombinant Immune Interferon Increases Immunoglobulin G Fc Receptors on Cultures Human Mononuclear Phagocytes. *The American Society for Clinical Investigation, Inc.* **72**, 393–397 (1983).
- <sup>54</sup> Perussia, B., Dayton, E. T., Lazarus, R., Fanning, V. & Trinchieri, G. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *The Journal of experimental medicine* **158**, 1092–113 (1983).
- <sup>55</sup> Fleit, H. & Kobasiuk, C. The Human Cell Line THP-1 Expresses FcγRI and FcγRII. *J. Leukoc. Biol.* **49**, 556–565 (1991).
- <sup>56</sup> Wang, Y., Curry, H. M., Zwilling, B. S. & Lafuse, W. P. Mycobacteria inhibition of IFN-γ induced HLA-DR gene expression by up-regulating histone deacetylation at the promoter region in human THP-1 monocytic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 5687–94 (2005).
- <sup>57</sup> Wu, L., Martin, T. D., Carrington, M. & KewalRamani, V. N. Raji B cells, misidentified as THP-1 cells, stimulate DC-SIGN-mediated HIV transmission. *Virology* **318**, 17–23 (2004).
- <sup>58</sup> Trost, M. *et al.* The phagosomal proteome in interferon-γ-activated macrophages. *Immunity* **30**, 143–54 (2009).
- <sup>59</sup> Chen, C.-L., Wang, Y., Sesaki, H. & Iijima, M. Myosin I Links PIP3 Signaling to Remodeling of the Actin Cytoskeleton in Chemotaxis. *Science Signaling* **5**, ra10–ra10 (2012).
- <sup>60</sup> Kahle, N. A., Brenner-Weiss, G., Overhage, J., Obst, U. & Hänsch, G. M. Bacterial quorum sensing molecule induces chemotaxis of human neutrophils via induction of p38 and leukocyte specific protein 1 (LSP1). *Immunobiology* **218**, 145–51 (2013).
- <sup>61</sup> Petering, H. *et al.* Detection of MCP-4 in dermal fibroblasts and its activation of the respiratory burst in human eosinophils. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **160**, 555–8 (1998).
- <sup>62</sup> Zhou, D. *et al.* Phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce haptotactic migration of human monocytes. *The Journal of biological chemistry* **270**, 25549–56 (1995).

- <sup>63</sup> Rashidbaigi, a, Kung, H. F. & Pestka, S. Characterization of receptors for immune interferon in U937 cells with 32P-labeled human recombinant immune interferon. *The Journal of biological chemistry* **260**, 8514–9 (1985).
- <sup>64</sup> Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization : enabling diversity with identity R p. *Nature Reviews Immunology* **11**, 750–761 (2011).
- <sup>65</sup> Olson, E. N. & Nordheim, A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 353–365 (2010).
- <sup>66</sup> Casbon, A.-J., Long, M. E., Dunn, K. W., Allen, L.-A. H. & Dinauer, M. C. Effects of IFN- $\gamma$  on intracellular trafficking and activity of macrophage NADPH oxidase flavocytochrome b558. *Journal of leukocyte biology* **92**, 869–82 (2012).
- <sup>67</sup> Wu, R. F., Gu, Y., Xu, Y. C., Nwariaku, F. E. & Terada, L. S. Vascular endothelial growth factor causes translocation of p47phox to membrane ruffles through WAVE1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 36830–40 (2003).
- <sup>68</sup> Tamura, M., Kai, T., Tsunawaki, S., Lambeth, J. D. & Kameda, K. Direct interaction of actin with p47(phox) of neutrophil NADPH oxidase. *Biochemical and biophysical research communications* **276**, 1186–90 (2000).
- <sup>69</sup> Touyz, R. M., Yao, G., Quinn, M. T., Pagano, P. J. & Schiffrin, E. L. p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**, 512–8 (2005).
- <sup>70</sup> Gehring, A. J. *et al.* The Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infection and immunity* **71**, 4487–97 (2003).
- <sup>71</sup> Wang, Y., Curry, H. M., Zwillig, B. S. & Lafuse, W. P. Mycobacteria inhibition of IFN-gamma induced HLA-DR gene expression by up-regulating histone deacetylation at the promoter region in human THP-1 monocytic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174**, 5687–94 (2005).
- <sup>72</sup> Aktories, K. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 487–98 (2011).
- <sup>73</sup> Taylor, M. P., Koyuncu, O. O. & Enquist, L. W. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 427–39 (2011).
- <sup>74</sup> Grage-Griebenow, E., Flad, H. D. & Ernst, M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of leukocyte biology* **69**, 11–20 (2001).
- <sup>75</sup> THP-1 (ATCC® TIB-202™). at <<http://www.atcc.org/Products/All/TIB-202.aspx>>.
- <sup>76</sup> Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer. Journal international du cancer* **26**, 171–6 (1980).