



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Determinación de la expresión de los receptores Fcγ en células del sistema monocito/macrófago bajo diferentes estados de activación y las consecuencias en sus funciones efectoras

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
QFB. ANA DIANA RIVERA FUENTES

TUTOR PRINCIPAL
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE ADSCRIPCIÓN

DRA. MARÍA GLORIA SODEVILLA MELGAJERO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (UNAM)
DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA (CINVESTAV SUR)

MÉXICO, D. F. Noviembre, 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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Dr. Enrique Ortega, del Departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas con el apoyo económico de CONACYT (proyecto 178803) y de DGAPA, UNAM (proyecto IN204012). Y la beca otorgada por CONACYT.

Agradezco a la cDra. Claudia A. Garay Canales por su apoyo técnico a lo largo de este trabajo.

Contenido

RESUMEN	6
MARCO TEORICO	7
MACRÓFAGOS INFLAMATORIOS (MØinf) [Macrófagos activados por vía clásica]	9
MACRÓFAGOS REPARADORES DE TEJIDO (MØrep).....	10
MACRÓFAGOS REGULADORES (MØreg).....	11
MARCADORES EN LA POLARIZACIÓN Y PLASTICIDAD DE MACRÓFAGOS	12
RECEPTORES PARA LA FRACCIÓN CONSTANTE DE ANTICUERPOS DEL ISOTIPO IgG.....	16
FcγRI (CD64).....	18
FcγRII (CD32).....	18
FcγRIII (CD16)	19
EXPRESION DE FcγRs EN MACRÓFAGOS	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
HIPOTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
METODOLOGIA	24
DIFERENCIACIÓN DE CELULAS THP-1 A MACROFAGOS.....	24
INDUCCIÓN DE SUBPOBLACIONES DE MACRÓFAGOS	24
INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA	25
INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA	25
INMUNOFLUORESCENCIA INTRACELULAR	26
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA.....	27
DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA PCR EN TIEMPO REAL	28

EXTRACCIÓN DE RNA.....	29
TRATAMIENTO CON DNAasa	30
SÍNTESIS DE cDNA.....	30
PCR EN TIEMPO REAL	31
PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR PARA SECUENCIAR.....	31
RESULTADOS.....	33
DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS Y POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS	33
EXPRESIÓN DE CD206, CD163 Y CD80.....	36
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN MACRÓFAGOS POLARIZADOS.....	38
DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RNAm PARA FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII POR RT-PCR EN MACRÓFAGOS POLARIZADOS	40
SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR PUNTO FINAL	43
DIFERENCIAS EN LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE MONOCITOS, MACRÓFAGOS CERO Y MACRÓFAGOS POLARIZADOS.....	45
DISCUSIÓN.....	51
PERSPECTIVAS	63
CONCLUSIONES	64
ANEXOS	65
BIBLIOGRAFIA.....	71

RESUMEN

Los macrófagos son una población celular de un alto grado de heterogeneidad, la cual tiene características morfológicas y funcionales distintas que dependen del sitio anatómico donde residan, así como de su activación en respuesta a estímulos del microambiente. La caracterización de los diversos estados de polarización de los macrófagos es un área de estudio importante por su relevancia tanto para la inducción de una respuesta inmune efectiva como por su participación en ciertas patologías. El presente trabajo, tiene como objetivo establecer un modelo *in vitro* de polarización de macrófagos, en el cual se determinaron los cambios en la expresión de los receptores Fcγ y su repercusión en sus funciones efectoras. Células de la línea celular monocítica THP-1 se diferenciaron a células tipo macrófagos por tratamiento con PMA. Las células resultantes fueron expuestas a diferentes citocinas para polarizarlas a tres subpoblaciones de macrófagos: IL-4 para macrófagos reparadores de tejido, IL-10 para macrófagos reguladores e INFγ para macrófagos inflamatorios, para corroborar el fenotipo de cada subpoblación polarizada se utilizaron los marcadores CD206, CD163 y CD80, respectivamente.

Al evaluar la expresión de los FcγRs en estas células, se observó que en los macrófagos reguladores hay aumento en la expresión de todas las isoformas de FcγRs, además del incremento del 50% en su capacidad fagocítica con respecto a los macrófagos no polarizados. En los macrófagos reparadores de tejido hay un aumento en la expresión de FcγRIIb (inhibitorio) y una disminución del 20% en su capacidad fagocítica. A pesar de que los macrófagos inflamatorios muestran un perfil activador, con incrementos en la expresión de FcγRI, FcγRIIa y FcγRIII, la capacidad fagocítica de estos disminuye en 24% con relación a los macrófagos no polarizados. Este modelo puede servir para evaluar diversos factores que modulen el estado de polarización, así como para estudios de las características fenotípicas y funcionales de cada subpoblación.

MARCO TEORICO

Dentro de los leucocitos residentes en tejido más ampliamente estudiados se encuentran los macrófagos, los cuales junto con sus precursores en circulación forman parte del llamado sistema monocito/macrófago. Una de las características principales de estas células es la de tener una importante capacidad fagocítica, por lo cual también son considerados como fagocitos profesionales, junto con los leucocitos polimorfonucleares. Los macrófagos tisulares son una muy importante población que participa como centinela, censando lo que ocurre en los tejidos periféricos para integrar esta información y realizar las actividades apropiadas o requeridas para mantener la homeostasis. Colaboran con la respuesta inmune innata, además de participar en la transición a la respuesta inmune adaptativa. (Beutler 2004)

En general, se acepta que los precursores de los macrófagos tisulares son los monocitos de la circulación sanguínea los cuales pueden adherirse a receptores expresados por células endoteliales activadas por señales proinflamatorias, y en respuesta a señales quimiotácticas son capaces de cruzar el endotelio vascular para llegar a los tejidos, un proceso conocido como migración transendotelial. El microambiente local en los tejidos y la interacción con la matriz extracelular y con factores específicos, llevan al monocito a empezar su diferenciación a macrófago, adquiriendo un fenotipo morfológico y funcional particular del órgano o tejido del cual se vuelve residente (Peracchia 2001).

Se han definido tres subpoblaciones de monocitos en circulación, con base a la expresión de tres marcadores de membrana: CD14, CD16 y CD64. Estas tres poblaciones son: a) monocitos CD14^{hi}CD16⁻CD64⁺, también llamados monocitos *clásicos* por ser los que poseen la mayoría de las características originalmente descritas para los monocitos, y son los que migran a los tejidos en situaciones de inflamación; b) monocitos CD14⁺CD16⁺CD64⁻, que han sido llamados monocitos *residentes*, por ser capaces de migrar a los tejidos para regenerar la poza de macrófagos y células dendríticas residentes en los tejidos (Taylor 2005); y c) monocitos

CD14⁺CD16⁺CD64⁺ que tienen expresión alta de CD86 y HLA-DR, y que se consideran un fenotipo *intermedio*. Sin embargo, recientemente se han aportado diversas evidencias que sugieren que los macrófagos residentes en tejido pueden auto renovarse; estos macrófagos podrían tener como precursor una célula más inmadura que el estadio de diferenciación de monocito (Hashimoto 2013).

Con base en lo anterior, es claro que el sistema monocito/macrófago es una población celular altamente heterogénea. Una vez diferenciados, los macrófagos presentan una notable plasticidad, lo que les permite cambiar su fenotipo y fisiología para así responder de manera eficiente a las señales del medio ambiente. Al proceso por el cual un macrófago, en respuesta a citocinas o productos microbianos, adquiere o modula sus capacidades funcionales y/o sus moléculas de membrana, se le llama “polarización” del macrófago (Mosser 2008). Es importante subrayar que la polarización del macrófago no dispara sus funciones efectoras, solamente cambia la capacidad de la célula para llevar a cabo las funciones efectoras propias del macrófago con mayor o menor eficiencia.

Haciendo un símil con los dos tipos de linfocitos T cooperadores inicialmente identificados (Th1 y Th2), se han definido dos principales tipos de activación de macrófagos: M1 (o **activación clásica**) se denomina a la activación inducida por la exposición a INFγ y LPS; y M2 (o **activación alterna**) a la activación inducida por la exposición a IL-4 y/o IL-13 (Mosser 2008).

Más recientemente, se ha propuesto que es más útil clasificar los tipos de activación de macrófagos por las funciones que pueden llevar a cabo con mayor eficiencia, y no por las citocinas que lo inducen (Edwards 2008). Resultado de esto se ha propuesto reconocer tres tipos principales de macrófagos activados: a) macrófagos inflamatorios ó activados por vía clásica; b) macrófagos reparadores de tejido y c) macrófagos reguladores.

MACRÓFAGOS INFLAMATORIOS (MØinf) [Macrófagos activados por vía clásica]

Esta subpoblación de macrófagos se encuentra enriquecida en ambientes de inflamación, después de haberse despertado una respuesta inmune celular (Mosser 2008). Las citocinas que inducen la polarización de macrófagos hacia este fenotipo son citocinas pro-inflamatorias como INF γ y TNF α ; también es posible utilizar algún activador de la secreción de TNF, como ligandos de TLRs (p. ej. LPS).

El INF γ es producido por células tanto del sistema inmune innato como por células del sistema adaptativo, entre las cuales están los linfocitos T CD4 $^{+}$ (Th1), linfocitos T CD8 $^{+}$, y células asesinas naturales (NKs), en respuesta a estrés o a un proceso infeccioso (Martinez 2009). La fuente primaria de INF γ son las células NKs. Sin embargo, esta secreción es transitoria, y en fases posteriores de la infección los linfocitos Th1 que arriban al tejido inflamado mantienen este tipo de polarización mediante la secreción de INF γ .

Estos macrófagos, también denominados M1, se caracterizan por un aumento en la expresión de moléculas del MHC-II, CD86 y algunos receptores de quimiocinas, además de su habilidad de secretar citocinas pro-inflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-21 e IL-18. (Fairweather 2009). La secreción de IL-1 sumada a la secreción de IL-6 e IL-23, están asociadas con el desarrollo de linfocitos Th17, los cuales secretan IL-17 y colaboran con el ambiente inflamatorio al reclutar neutrófilos (Kolls 2004).

Los macrófagos activados por la vía clásica desempeñan un papel muy importante en la defensa del hospedero contra patógenos como bacterias. Para cumplir eficientemente esta función, una de las primeras características que se ven incrementadas en relación a células no activadas, es su capacidad microbicida. Gracias a la inducción de la expresión de la enzima iNOS, hay un incremento en la producción de NO $_2^-$, así como del metabolismo de arginina (Mosser 2008), asociados a un aumento en la capacidad microbicida dependiente de nitrógeno.

En humanos y modelos murinos, la deficiencia de INFγ lleva a una susceptibilidad a infecciones por bacterias, protozoarios y virus; lo cual muestra la importancia de esta citocina en la respuesta inmune contra patógenos.

MACRÓFAGOS REPARADORES DE TEJIDO (MØrep)

Esta subpoblación se genera por la polarización de los macrófagos en presencia de IL-4, sola o en conjunto con IL-13. Se han observado presentes principalmente en infecciones por helmintos (Tundup 2012), en procesos como asma y rinitis alérgica (Krysko 2011), y en situaciones de remodelación de tejido, como en implantes (Brown 2012).

En el caso de los linfocitos T CD4+, la característica distintiva de linfocitos cooperadores de fenotipo Th1 o Th2 se relaciona con su secreción de INFγ o IL-4, respectivamente, ya que la secreción de estas citocinas es mutuamente excluyente. Esto se debe a que en cada fenotipo activa un programa de transcripción génica diferente, con la participación de factores de transcripción específicos para cada fenotipo; se propone que lo mismo ocurre con los macrófagos M1 y M2. Akira y colaboradores (Akira 2012) demostraron en un modelo murino de infección por helmintos, en el cual la desmetilasa de histonas Jmjd3, asociada al factor de transcripción *Irf4*, era esencial para la polarización de macrófagos al fenotipo M2. Por su parte, el grupo de trabajo de Udalova (Krausgruber 2011), demostró la importancia de *Irf5* en la polarización hacia el fenotipo M1; la expresión de estos factores de transcripción parece ser mutuamente excluyente.

Varios tipos celulares pueden secretar las citocinas que polarizan a un macrófago hacia el fenotipo reparador de tejido (IL-4 e IL-13), algunas de las cuales son células de la inmunidad innata como células NK, basófilos, eosinófilos y células cebadas, pero la producción sostenida de estas citocinas la llevan a cabo células de la respuesta adaptativa como linfocitos T CD4+ Th2 y linfocitos T CD8+ (Martinez 2009).

La principal característica fenotípica de esta subpoblación de macrófagos es el importante aumento en la expresión del receptor de manosa (CD206), así como el de otros receptores tipo lectina C, como Dectina-1. También se ha observado un incremento en la expresión de MHC-II (Audrey Varin 2009), lo cual lleva a pensar en una subpoblación con una fagocitosis y presentación de antígeno muy activa. Por el contrario, producen una baja cantidad de citocinas pro-inflamatorias, así como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, observándose disminuido el metabolismo de la arginina. (Edwards 2006; Mosser 2008). Una característica peculiar de esta subpoblación es la abundante secreción de componentes de matriz extracelular (como colágeno y fibronectina), por lo cual se les asocia a la reparación del tejido.

La activación de los macrófagos reparadores de tejido por IL-4 e IL-13, contribuye a la eliminación de infecciones por helmintos y nematodos. Sus altos niveles de expresión de Arginasa 1, la cual se encuentra en la vía de producción de ornitina, contribuye con la producción de colágeno, lo que les ha llevado a adquirir el nombre de reparadores o remodeladores de tejido. Aunado a esto, los macrófagos M2 están asociados con marcadores importantes de la remodelación de tejidos, como TGF- β , fibronectina, factor de coagulación XIIIa, entre otros (Van Ginderachter 2006).

MACRÓFAGOS REGULADORES (M ϕ reg)

Además de la activación alternativa de macrófagos favorecida por IL-4 e IL-13, moléculas como glucocorticoides y complejos inmunes generan una variante de macrófagos alternativos nombrados M2c. Las células producto de esta activación han sido denominados macrófagos reguladores. Existen diferentes formas de generar macrófagos reguladores, pero la vía de señalización claramente identificada como activadora de esta polarización es la mediada por las cinasas activadas por mitógenos o MAPKs (Mosser 2008). Esta población de macrófagos se identificaron por vez primera tras el tratamiento con una combinación de ligandos de TLRs e inmunocomplejos (Gerber 2001). Los macrófagos reguladores secretan elevadas concentraciones de IL-10. La presencia de esta citocina induce también la polarización hacia

este fenotipo. Otros factores que colaboran con la generación de macrófagos reguladores son células apoptóticas, y ligandos de receptores acoplados a proteínas G, como las prostaglandinas. Una de las características peculiares de la polarización hacia este fenotipo regulador, parece ser la necesidad de dos estímulos. El estímulo inicial con alguna de las moléculas antes mencionadas, más un segundo estímulo como ligandos de TLRs. Esto induce la reprogramación de las células para secretar IL-10 y tener una actividad anti-inflamatoria (Edwards 2006).

Son varias las células que pueden colaborar para inducir la polarización hacia esta clase de macrófagos, entre ellas, la actividad de la glándula pituitaria en condiciones de estrés, los glucocorticoides secretados por las glándulas adrenales (Elenkov 2004) y aquellas citocinas, como IL-10, que son secretadas por células del sistema inmune tras una prolongada respuesta adaptativa y que tienen como objetivo limitar un proceso inflamatorio (Mosser 2003). La presencia de macrófagos con estas funciones también se ha observado en los llamados Macrófagos asociados a tumores (TMA; tumor associated-macrophages); y se les ha clasificado como reguladores por su alta secreción de citocinas anti-inflamatorias, lo que parece colaborar en el establecimiento del tumor (Brown 2012).

Parásitos como *Leishmania spp*, la toxina de *Bacillus anthracis*, el virus del Dengue, así como el microambiente alrededor de células tumorales, induce la diferenciación a macrófagos con fenotipo regulador, cuyas características principales son la alta secreción de IL-10 y la expresión de marcadores de superficie como CCL1 (Mosser 2008).

MARCADORES EN LA POLARIZACIÓN Y PLASTICIDAD DE MACRÓFAGOS

Los macrófagos maduran al ser expuestos a microambientes específicos generados por diversas condiciones, tanto fisiológicas como patológicas, del tejido en particular. Estas condiciones generan un microambiente con alta complejidad, compuesto por una amplia diversidad de factores en el medio, entre ellos la presencia de fármacos y el estado de

homeostasia; los macrófagos presentes son capaces de censar los cambios del microambiente a través de diversos receptores (Figura 1), y adoptan un fenotipo adecuado para las nuevas condiciones. En microambientes tan complejos y a la vez cambiantes, se ha propuesto que los macrófagos pueden adaptarse polarizándose a otro fenotipo de forma dinámica, cambiando así su capacidad para cumplir con ciertas funciones efectoras, a lo cual se le determina *plasticidad*.

El fenotipo de los macrófagos está determinado por la respuesta de éstos a un determinado microambiente; al activar a la célula con ciertas señales presentes en el microambiente circundante se induce la secreción de citocinas y la expresión de moléculas que le permitan desempeñar de manera óptima funciones como el reconocimiento (PRRs o receptor de manosa), producción de citocinas y especies reactivas, y también funciones más complejas como fagocitosis. La idea central sobre la plasticidad propone que todos estos cambios son reversibles, y permiten la adaptación de la célula a un ambiente cambiante (Stout 2005; Stout 2009).

En estudios *in vitro* se ha intentado identificar los cambios que pueden ser reversibles en macrófagos polarizados a distintos fenotipos. Los macrófagos son una importante fuente de citocinas, dos de ellas son IL-12 e IL-10, consideradas pro-inflamatoria y antiinflamatoria respectivamente, el balance entre la secreción de cada una de ellas fue una de las primeras evidencias de la polarización (Edwards 2006). Stout y colaboradores trabajaron estimulando macrófagos con citocinas, observaron cómo se adaptaban los macrófagos a ellas y si eran capaces de adaptarse también a cambios secuenciales del patrones de citocinas, finalmente monitorearon como afectaba esto su capacidad funcional. Al tratar las células con citocinas Th2 como primer estímulo, y como segundo estímulo con LPS, observaron que había un aumento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias y una disminución de las citocinas antiinflamatorias (Stout 2005). Se ha observado también que macrófagos M1 pueden ser re-polarizados *in vitro* a macrófagos M2 y viceversa, usando INFγ y LPS o IL-4 e IL-10 como un estímulo secundario, respectivamente (Gratchev 2006). Ambos trabajos aportan fundamentos importantes en el fenómeno de plasticidad en los macrófagos.

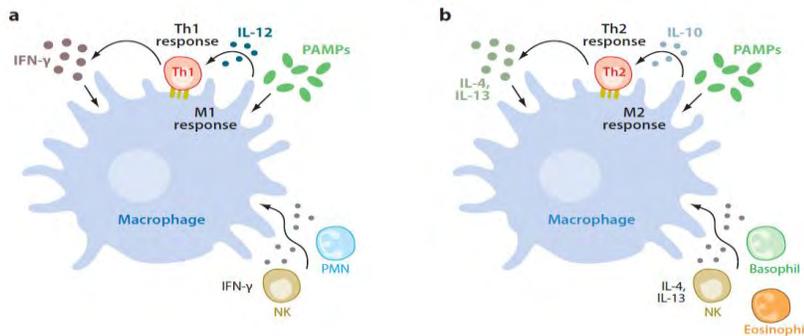


Figura 1. Activación clásica y alternativa de los macrófagos. En similitud con la polarización de la secreción de citocinas por linfocitos T CD4+ tras su estimulación, se ha propuesto clasificar a las poblaciones de macrófagos activados como a) macrófagos activados por vía clásica (M1), mediada por IFN γ , b) Macrófagos activados por vía alterna (M2), la cual puede ser mediada por IL-4 y/o IL-13. Se ha propuesto además una población de macrófagos reguladores, caracterizados por la alta secreción de IL-10. (Martinez 2009)

El poder determinar el estado de polarización en el cual se encuentra una población de macrófagos ha sido un reto importante, debido a la complejidad y utilidad que representa poder identificar que subpoblación está participando en cierto estado patológico o de homeostasia, o incluso identificar si se trata de una población en estado de polarización intermedio. Han sido varios los investigadores que han buscado definir marcadores específicos para cada una de estas subpoblaciones de macrófagos. Lo más común ha sido el empleo de marcadores de membrana específicos para cada subpoblación (Jaguin 2013), aunque también se ha considerado emplear otros criterios, como la presencia de especies de micro RNA interferentes (Graff 2012). Así mismo, se han realizado estudios analizando el perfil transcripcional de cada subpoblación (Martinez 2006), así como análisis de los factores de transcripción y vías de señalización activadas en cada fenotipo (Biwas 2011; Akira 2012; Akira. S. Satoh 2012).

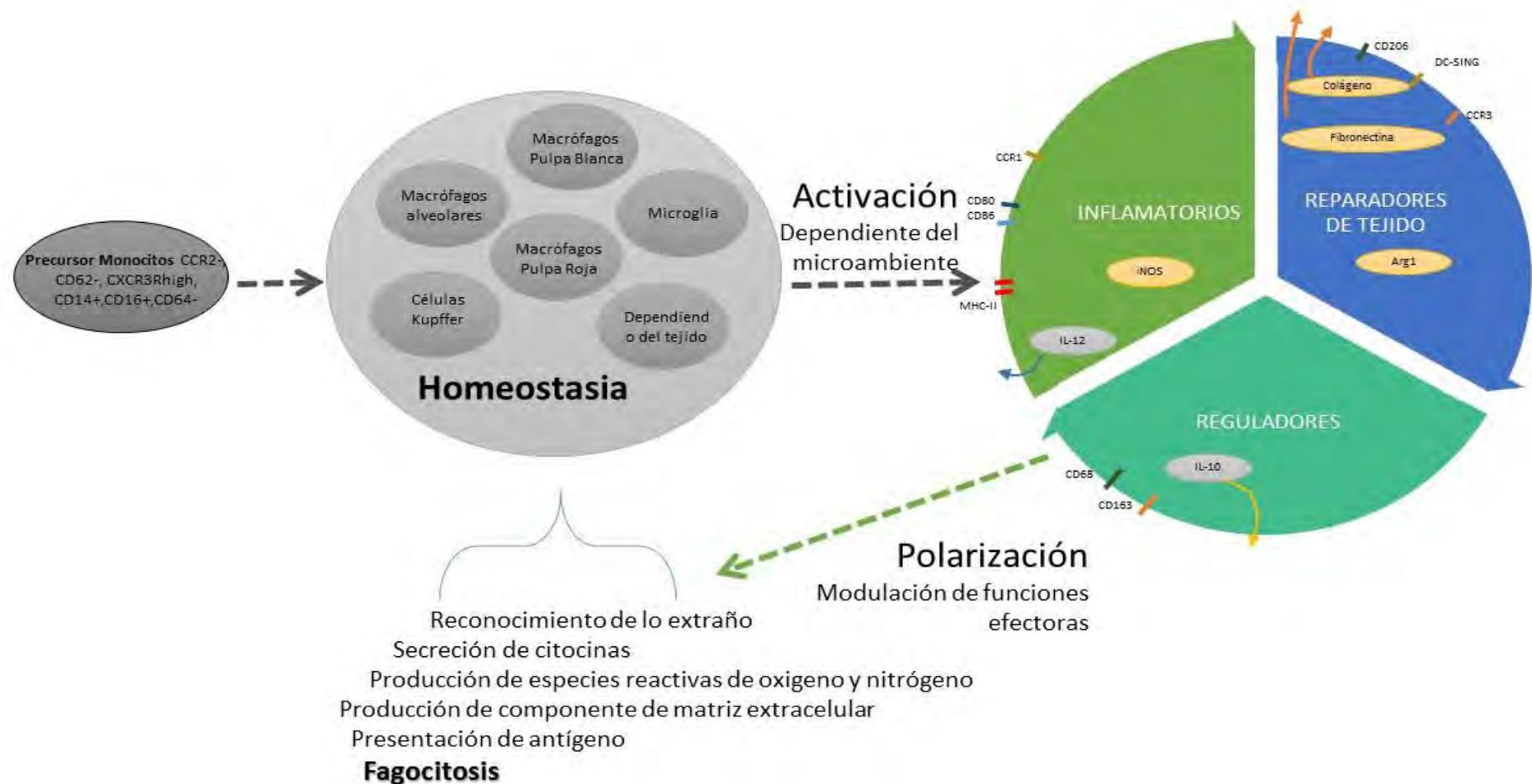


Figura 2. Proceso de diferenciación, maduración y polarización en el sistema monocito/macrófago. Monocitos circulatorios “residentes” se diferencian y mantienen la población de macrófagos residentes de tejido en condiciones de homeostasia. Frente a un estímulo las células son activadas para iniciar su proceso de activación y polarización. Los macrófagos polarizados modulan positiva o negativamente ciertas funciones efectoras específicas de esta estirpe celular, logrando así una mejor capacidad de respuesta a las necesidades y particularidades del microambiente. (Taylor 2005; Mosser 2008)

Estudios como los anteriores han identificado una amplia variedad de marcadores para la caracterización del estado de polarización de los macrófagos. Algunos de estos marcadores se reconocen como clásicos (o exclusivos) de cada subpoblación, por ejemplo, el receptor de manosa (CD206) se ha identificado como marcador para identificar a macrófagos reparadores de tejido. Por su parte los macrófagos reguladores presentan una alta expresión de CD163, un receptor “basurero” (scavenger), mientras que las moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 se ven incrementadas en macrófagos inflamatorios. Se ha demostrado que la expresión de estos receptores es un proceso reversible, esto cobra importancia cuando las células modulan el nivel de expresión de ciertos marcadores (Porcheray 2005). Un ejemplo de esto ocurre en los macrófagos reguladores de tejido, cuya principal característica es una alta secreción de proteínas de matriz extracelular, como fibronectina y colágena entre otras, aunado a esto se ha demostrado que pueden cambiar su fenotipo entre macrófagos M2 y macrófagos M1, si se reemplazan las citocinas en el medio, demostrando así que aún polarizadas, las células mantienen una importante plasticidad (Figura 2) (Ploeger 2011).

Los macrófagos llevan a cabo una amplia diversidad de funciones; sin embargo, una muy importante, y por la cual se le ha asignado su nombre es la fagocitosis. La fagocitosis es un proceso mediante el cual una célula internaliza partículas mayores a 0.5-1.0 μm , en un proceso activo y dependiente de la polimerización de actina. Existen diversos receptores que permiten a la célula reconocer al patógeno y llevar a cabo la fagocitosis del mismo, como la familia de lectinas de tipo C, los receptores basurero o scavenger, los receptores para opsoninas, como los receptores para complemento y los receptores para la fracción constante de los anticuerpos, etc. (Stuart 2005).

RECEPTORES PARA LA FRACCIÓN CONSTANTE DE ANTICUERPOS DEL ISOTIPO IgG

De los anticuerpos en circulación, las inmunoglobulinas del isotipo G son las más abundantes y las que tienen el tiempo de vida media más largo. La IgGs puede actuar como opsonina, mediando la fagocitosis de partículas por medio de la unión de su porción Fc a receptores de

membrana expresados por varios tipos celulares (Daëron 1997). Con base a las características estructurales, se han definido tres tipos de receptores para IgG en humanos: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) (Figura 3). Los receptores de las tres clases contienen regiones extracelulares conservadas, pero sus regiones citoplasmáticas difieren entre sí, lo cual les brinda diferentes propiedades funcionales. A través de ellos los anticuerpos pueden mediar un amplio rango de funciones efectoras por distintos leucocitos, tanto en células de la inmunidad innata y la adaptativa (Boross 2008). Los tres tipos de receptores FcγR pueden ser expresados en macrófagos. A continuación se mencionan sus características principales, así como las funciones en que participan cada uno de ellos.

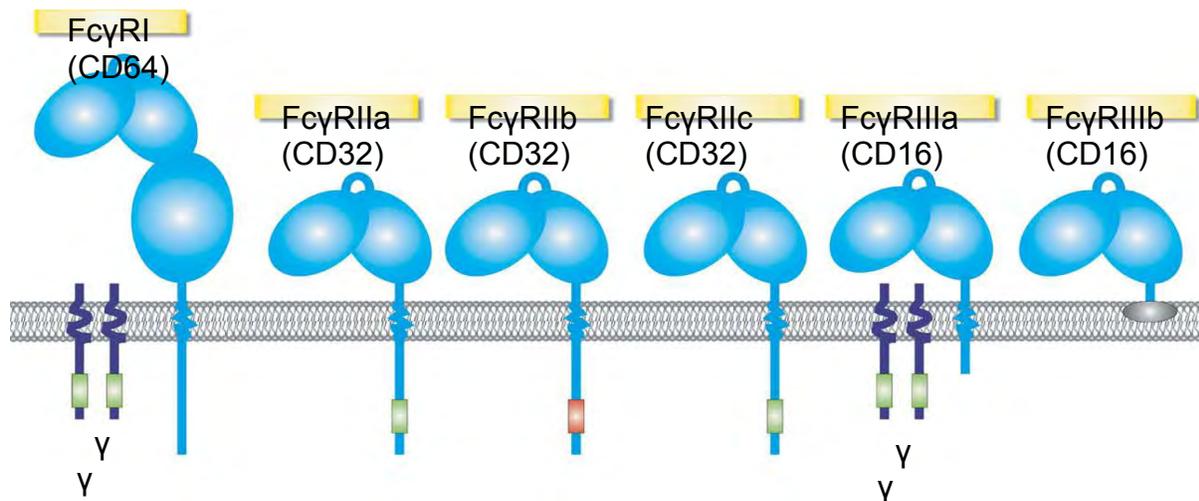


Figura 3. Representación esquemática de las diferentes clases de FcγRs. (Indik 1995; Boross 2008) La región extracelular (que une a las IgG) está formada por dos o tres dominios de inmunoglobulina. La capacidad de transducción de señales es mediada por los motivos ITAM. En el FcγRI y FcγRIIIa, los motivos ITAM se encuentran en las subunidades y asociadas al receptor. En el caso de FcγRIIa y IIc su propia región citoplásmica contiene los motivos ITAM; mientras que el FcγRIIb contiene un motivo ITIM inhibitorio. El FcγRIIIb no contiene región citoplásmica.

FcγRI (CD64)

El FcγRI está constituido por una región extracelular con tres dominios de inmunoglobulina, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática. Es considerado como un receptor de alta afinidad para IgG monomérica, la afinidad de este receptor para las diferentes subclases de IgG varía de la siguiente forma: IgG3 > IgG1 > IgG2. El FcγRI existe como un complejo heterooligomérico formado por la cadena α que se une al ligando y un homodímero de subunidades FcR- γ . La subunidad γ es esencial para inducir fagocitosis, debido a que en ella están presentes los motivos de activación basados en tirosinas (ITAM) esenciales para la activación de vías de señalización. La subunidad α también participa en la estabilización del receptor en la superficie de la célula y en la afinidad de unión a su ligando (Indik 1995).

Los fagocitos profesionales expresan constitutivamente FcγRI y la subunidad γ . El FcγRI es un receptor altamente expresado en monocitos, macrófagos y en algunas poblaciones de células dendríticas. Las funciones efectoras que puede iniciar este receptor en las células que lo expresan son diversas: internalización del antígeno, generación de radicales libres de oxígeno, citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), fagocitosis y producción de citocinas.

FcγRII (CD32)

En el humano, se han identificado tres genes que codifican receptores del tipo II: FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIC. Estructuralmente, los FcγRIIs son moléculas con regiones extracelulares y transmembranales muy conservadas, pero la región citoplasmática difiere entre las tres isoformas. Este receptor no requiere de subunidades accesorias, ya que en su región citoplásmica contiene los motivos ITAM en el caso de los receptores activadores (FcγRIIA y FcγRIIC), o un motivo inhibitorio basado en tirosinas (ITIM) en el caso del receptor con actividad inhibitoria (FcγRIIB). El entrecruzamiento de los receptores resulta en la fosforilación de las tirosinas del ITAM y/o del ITIM de la cadena.

Siendo receptores de baja afinidad, los FcγRII sólo pueden interactuar con complejos inmunes o IgG agregada. Es el receptor que se expresa en el mayor número de tipo celulares además de fagocitos profesionales; entre las células que expresan este receptor están los monocitos y macrófagos, eosinófilos, basófilos, plaquetas, linfocitos B, células endoteliales placentarias y algunas subpoblaciones de linfocitos T. Las funciones con las que colaboran en la respuesta inmune los receptores de la subclase activadora son similares a aquellas en las que participa el receptor FcγRI: producción de citocinas, internalización, fagocitosis, citotoxicidad mediada por anticuerpo, estallido respiratorio, etcétera. Por su parte, la forma inhibitoria (FcγRIIb) colabora en la regulación negativa de la estimulación por el BCR en linfocitos B, y de la estimulación por receptores FcγR activadores en las células que los expresan.

FcγRIII (CD16)

Existen dos isoformas del FcγRIII codificadas por dos genes: FcγRIIIA y FcγRIIIB. El FcγRIIIa tiene dos dominios de inmunoglobulina extracelulares y una cola citoplásmica, y es considerado un receptor de afinidad media para la IgG. La expresión y función de este receptor depende de su asociación con la subunidad γ y en monocitos y macrófagos, y con la subunidad ζ en células asesinas naturales (NK). La subclase FcγRIIIb no tiene porción transmembranal y se une a la membrana a través de un glicosil-fosfatidil inositol; exhibe baja afinidad para IgG y se expresa exclusivamente en PMNs.

EXPRESION DE FcγRs EN MACRÓFAGOS

Los macrófagos y monocitos expresan constitutivamente la mayoría de las isoformas de FcγRs activadores, así como la isoforma inhibitoria. A través de estos receptores los macrófagos llevan a cabo diversas funciones efectoras como la fagocitosis y el estallido respiratorio, propiedades importantes de los macrófagos como células que participan como primera línea de defensa. Es

por ello la importancia que representa estudiar los cambios en la expresión de estos receptores bajo diferentes microambientes y estados de polarización de los macrófagos.

La expresión relativa de las formas activadoras y la forma inhibitoria de los FcγRs determina la intensidad con la que las señales de activación son generadas y su modulación por señales inhibitorias, lo cual permite la regulación de las funciones efectoras de la célula. Una muestra de ello es lo observado en modelos murinos deficientes de FcγRIIb, en los cuales se observa una reacción proinflamatoria exacerbada, y un aumento en la maduración de células dendríticas y en la presentación de antígeno (Nimmerjahn 2010). Estos ratones muestran además una alta susceptibilidad a enfermedades autoinmunes como los modelos murinos de Lupus Eritematoso Sistémico. Diversas investigaciones, en modelos experimentales y en condiciones patológicas, han abordado el estudio de los cambios en los niveles de expresión de las distintas isoformas de los FcγRs, demostrando que estos cambios modulan las funciones efectoras de los macrófagos, al alterarse el balance de las isoformas activadoras e inhibitorias.

Desde hace varios años se ha reportado que el tratamiento con INFγ incrementa la expresión de FcγRI, y posteriormente se demostró que en células U-937 la regulación positiva de la expresión de este receptor es mediada por cinasas dependientes de RNA de doble cadena (PKR) y del factor de transcripción NFκB. (Liu 2005; Karehed 2007). La estimulación de los macrófagos únicamente con INFγ resulta en una ineficiente fagocitosis, y los lleva a ser células incapaces de eliminar a un parásito intracelular como *Leishmania spp.*. Sin embargo, si la estimulación es hecha con IFNγ en conjunto con TNFα, o algún ligando de TLRs como LPS, las células serán capaces de eliminar al patógeno (Mosser 2008).

Los cambios en la expresión de FcγRII representan un panorama diferente, debido a que se debe considerar las dos isoformas de este receptor: la activadora (FcγRIIa) y la inhibitoria (FcγRIIb). En algunas enfermedades autoinmunes se ha propuesto que alteraciones en el balance entre estas dos isoformas lleva a los estados patológicos (Båve 2003; Xin-guang 2011); en experimentos *in vitro* se ha demostrado que en presencia de IL-10 y otras citocinas, altera el balance en la expresión de las formas activadoras e inhibitoria de este receptor, y esto tiene un

efecto en la activación de funciones efectoras, incluyendo la fagocitosis (Liu 2005). En células polarizadas a macrófagos reparadores de tejido, por IL-4 o IL-13, disminuye la expresión de los receptores FcγIIa y FcγIIb en membrana y también sus capacidades fagocíticas a través de los mismos. (Liu 2005)

El FcγRIII, con relación a los otros dos receptores, es el menos expresado en el sistema monocito/macrófago; sin embargo, en presencia de IL-10 su expresión aumenta considerablemente, incluso se ha propuesto como marcador para macrófagos reguladores junto a CD163 (Ambarus 2011). Al igual que lo observado para FcγRII, la fagocitosis a través de este receptor en presencia del IL-10 se ve incrementada.

Un ejemplo de cómo la plasticidad de los macrófagos también modifica la expresión de los FcγRs se observó en pacientes con Trombocitopenia Autoinmune Primaria. En este estudio, se observó una desregulación de la expresión de FcγRIIa y FcγRIIb en pacientes sin tratamiento, la cual se reconstituyó mediante el tratamiento con glucocorticoides (dexametasona en altas dosis) resultado de esto fue el incrementando los niveles de expresión de FcγRIIb (Xin-guang 2011). Con lo que respecta a una subpoblación reparadora de tejido, se reportó un efecto antagónico de IL-4 y glucocorticoides en moléculas relacionadas con la reparación de tejido en modelos murinos (Salmon-Ehr V 2000). Otros ejemplos de los cambios en el fenotipo de los macrófagos se han descrito en poblaciones presentes en infecciones virales, bacterianas y cáncer (Asahi 2008; Dugast 2011).

Los estudios realizados sobre la modulación de la expresión de los FcγRs en microambientes diferentes, han sido abordados con varios modelos celulares, y generalmente determinando los cambios que ocurren en un modo de polarización en comparación con células no activadas. El objetivo de este trabajo es utilizar un mismo tipo celular para abordar la modulación en la expresión de FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII, a nivel de mRNA y proteína, así como sus implicaciones en las funciones efectoras, como la fagocitosis, con la finalidad de aportar un panorama más homogéneo de la participación de los FcγRs en cada una de las subpoblaciones de macrófagos propuestas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tipos de estímulos que se encuentren el macrófago en el microambiente circundante, inducen cambios en sus características fenotípicas y funcionales, lo que lo convierte en un macrófago funcionalmente diferente (“polarización del macrófago”). En los últimos años ha cobrado importancia la caracterización de macrófagos en distintos estados de polarización, por su participación en diversas patologías. Se ha propuesto que se pueden distinguir tres tipos básicos (primarios) de macrófagos activados, relacionados a las funciones efectoras para las que están mejor preparados: macrófagos inflamatorios (o de defensa del hospedero), macrófagos reparadores de tejido y macrófagos reguladores.

Los macrófagos expresan en su membrana varios tipos de receptores FcγR, importantes para mediar funciones efectoras como la fagocitosis, estallido respiratorio y producción de citocinas. La expresión diferencial de estos receptores, y las distintas afinidades de cada uno de ellos por las subclases de IgG, están asociadas a patologías como aterosclerosis, lupus eritematoso sistémico, artritis, VIH, entre otras; patologías donde también se ha demostrado que hay una polarización preferencial de los macrófagos residentes, por lo que en algunos casos se ha propuesto que participan en la progresión de la enfermedad.

Al mismo tiempo, es difícil caracterizar funcionalmente estas subpoblaciones *in vivo*, por la posibilidad de estados de polarización intermedios, la plasticidad de estos estados, el número de células, etc. Adicionalmente, el estudio de estas subpoblaciones en modelos murinos puede no siempre reflejar el caso de macrófagos humanos. Es por lo tanto importante contar con un modelo que nos permita estudiar con detalle cómo se regula la expresión de diversas proteínas y como esto repercute en las funciones efectoras de los macrófagos, en distintos estados de polarización. En nuestro caso, deseamos estudiar cómo afecta el estado de polarización, la expresión de las distintas isoformas de receptores para IgG, y la relación de esto con una función efectora importante de los macrófagos: la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG.

HIPOTESIS

La polarización *in vitro* de células THP-1 diferenciadas a macrófagos hacia los tres fenotipos primarios: macrófagos inflamatorios, macrófagos reparadores de tejido o macrófagos reguladores, inducirá cambios distintos en la expresión de los receptores Fcγ, lo que repercutirá en su capacidad fagocítica.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la modulación de la expresión de las distintas isoformas de receptores para IgG, en un modelo *in vitro* de macrófagos bajo diferentes estados de polarización, así como la relación de esto con la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la diferenciación de células THP-1 a células tipo macrófago (THP-1-MØ).
- Estandarizar la polarización *in vitro* de THP-1-MØ a macrófagos: inflamatorios, reparadores de tejido y reguladores
- Determinar cuantitativamente por citometría de flujo, la expresión en membrana de FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII, en células del sistema monocito/macrófago en diferentes estados de polarización.
- Determinar cuantitativamente por RT-PCR el nivel de expresión ARNm de FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII, en células del sistema monocito/macrófago en diferentes estados de polarización.
- Determinar cuantitativamente la capacidad fagocítica de las células a través de los receptores FcγRs.
- Correlacionar el nivel de expresión (en mRNA y proteína) de cada uno de los receptores con la fagocitosis mediada por los mismos.

METODOLOGIA

DIFERENCIACIÓN DE CELULAS THP-1 A MACROFAGOS

Las células THP-1 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco) adicionado con 1 mM piruvato de sodio, 0.1 mM solución de aminoácidos no esenciales, 0.1 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, y 100 µg/ml estreptomicina, con suero fetal bovino (Gibco) al 10%. Las células se mantuvieron a una densidad celular entre 2×10^5 – 1×10^6 células por mililitro de medio.

En placas de 6 pozos (Nunc) se colocaron 1×10^6 células por pozo en 2mL de medio con una concentración final de 20nM de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich), por 5 días a 37°C y 5% de CO₂, haciendo un cambio de medio al día 2. Posteriormente se retiró el medio, y se colocaron las células en medio sin PMA por 2 días. Después de estos dos días, las células expresan características fenotípicas propias de macrófagos, como una morfología extendida y la expresión del receptor CD11b. Estas células fueron tratadas con la citocina correspondiente o con medio libre de citocinas, como se indica más adelante.

INDUCCIÓN DE SUBPOBLACIONES DE MACRÓFAGOS

Una vez que las células estuvieron 2 días sin PMA, se lavaron y se adicionó la citocina indicada en las concentraciones correspondientes. Para la generación de macrófagos inflamatorios se adicionó INF-γ (Preprotech) a una concentración final de 30ng/mL, evaluando el estado de polarización por la expresión de la molécula coestimuladora CD80, por la tinción con un anticuerpo anti CD80-APC (BD Pharmingen). Para obtener macrófagos reparadores de tejido se estimularon las células con IL-4 (Preprotech) a una concentración final de 40ng/mL, evaluando el estado de polarización por la expresión de CD206, con anticuerpo anti CD206-FITC (BD Pharmingen). Por último, los macrófagos reguladores fueron generados por la estimulación con IL-10 (Preprotech) a una concentración de 20ng/mL, y el efecto de esta citocina se evaluó mediante la expresión de CD163 con un anticuerpo anti-CD163-FITC (BD Pharmingen).

Se incubaron las células con citocinas por 48h, a 37°C y 5% CO₂. La determinación de la expresión de los receptores se realizó por citometría de flujo, mediante una inmunofluorescencia directa, con el siguiente protocolo.

INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

Para la citometría de flujo, se suspendieron 2×10^5 células en 200µL de amortiguador de lavados (PBS, SFB 5%, azida de sodio 0.01%) y se colocaron en tubos para FACS. Posteriormente se agregaron 3µL de cada uno de los anticuerpos anti-CD206-FITC, anti-CD163-PE y anti-CD80-APC. Se incubó protegido de la luz en hielo por 30' con agitación ocasional. Se lavó con amortiguador para lavados, centrifugando a 1400 rpm por 5' (Sorvall Legend March 1.6R) y se decantó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 200µL del amortiguador de lavados, esta operación se repitió dos veces más; el último lavado se realizó con PBS frío. Las células se resuspendieron finalmente en 200µL de paraformaldehído (PFA/PBS) al 1% y se incubaron (cubiertas de la luz) por 20 minutos en hielo. Al terminar la incubación se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200µL de PBS. Las células positivas se evaluaron en el citómetro de flujo (Attune), la intensidad media de fluorescencia sirvió como indicador del grado de expresión.

INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA

Para el caso de FcγRI y FcγRII, se utilizó una inmunofluorescencia indirecta. Se suspendieron 2×10^5 células en 200µL de amortiguador de lavados (PBS, SFB 5%, azida de sodio 0.01%) y se colocaron en tubos para FACS. Posteriormente se agregaron 5µL y 2.5 µL (FcγRI y FcγRII, respectivamente) de anticuerpo primario. Se incubó en hielo por 30' con agitación ocasional. Se lavó con amortiguador para lavados dos veces, centrifugando a 1400 rpm por 5' (Sorvall Legend March 1.6R) y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 200µL del amortiguador de lavados con el segundo anticuerpo 1:500 (Cabra anti- ratón FITC. Zymed 81-6511). Se incubó cubierto de la luz en hielo por 30' con agitación ocasional. Se lavó con amortiguador para lavados, centrifugando a 1400 rpm por 5' (Sorvall Legend March 1.6R) y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 200µL del amortiguador de lavados, esta operación se repitió dos veces más, el último lavado se realizó con PBS frío. Las células se

resuspendieron finalmente en 200µL de paraformaldehído (PFA/PBS) al 1% y se incubaron por 20 minutos en hielo cubierto de la luz. AL terminar la incubación se lavaron con PBS y se resuspendieron en 200µL de PBS. El porcentaje de células positivas se evaluó por citometría de flujo (Attune).

INMUNOFLUORESCENCIA INTRACELULAR

Para realizar la determinación en la expresión de FcγRIIa y FcγRIIb, se realizó una tinción intracelular. Por cada una de las condiciones se colocaron 1×10^6 células en 1mL de PFA al 4%, durante 10' a 4°C. Posteriormente se lavaron con 1mL PBS 1X, dos veces. Las células fueron incubadas con 1mL de PermWash 1X (BD PermWash Buffer 10X, Cat. No. 51-2091KZ (554723) por 15' a 4°C. Tras la permeabilización se resuspendieron en 200µL de PermWash 1X y se dispensaron 50µL de esta suspensión celular en placas de ELISA de fondo en U para incubarlas con los anticuerpos correspondientes: 5µL de anti-FcγRIIa (CD32-A, N-20, sc-12808, Santa Cruz Biotechnology) o anti-FcγRIIb (CD32-B, C-20, sc-12815, Santa Cruz Biotechnology), y 1.6µL del control de isotipo (Goat anti-mouse AP), se incubaron por 30' a 4°C. Posteriormente, para eliminar el exceso de anticuerpo se adicionaron 150µL de PermWash 1X y se centrifugaron por 3' a 1300 rpm (Centrifuge 5810C, Eppendorf), con un lavado más con 150µL de PermWash. Como solución de bloqueo las células se incubaron con 200µL de γ -globulina humana (Beriglobina P, Solución inyectable, Reg. No. 60871 SSA IV. CAL Behring) por 30' a 4°C, posteriormente se lavaron 3 veces con 150µL de PermWash 1X. Al final de estos lavados, las células se resuspendieron en 50µL de anticuerpo secundario anti-goat IgG- FITC (81-161, Zymed 1.5mg/mL), en una dilución de 1:600 diluido en PermWash 1X, y fueron incubadas 30' a 4°C en obscuridad. Finalmente se realizaron 2 lavados con 150µL de PermWash 1X y un lavado más con PBS 1X. Las células fueron resuspendidas en 200µL de PFA 1%, para su posterior captura en el citómetro (Attune).

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA

Para determinar la capacidad fagocítica se utilizaron eritrocitos de carnero como partículas a fagocitar. Los eritrocitos de carnero se mantuvieron en solución de Alsevers en esterilidad. Del fondo del frasco, sin mezclar, se tomaron 500µL de eritrocitos y se colocaron en 1mL de PBS con albumina sérica bovina (BSA) al 0.1%. Se realizaron 6 lavados centrifugando a 2000 rpm 3', y finalmente se resuspendieron en 1mL de PBS/BSA y se contaron en cámara de Neubauer, en una dilución 1:1000 con PBS.

Se tomaron 1×10^9 eritrocitos para colocarlos en un volumen final de 10mL de PBS/BSA 0.1%, al cual se adicionaron 25µL de éster de carboxifluoresceína (CFSE; C1157. Invitrogen), incubando 30' a 37°C. Posteriormente se hicieron 2 lavados con PBS/BSA 0.1%, para finalmente resuspender los eritrocitos en 2mL de PBS/BSA 0.1%. 500µL de esa suspensión fueron utilizados para realizar la opsonización de los eritrocitos.

Los eritrocitos marcados con CFSE se incubaron por 30' a temperatura ambiente con un suero policlonal anti-eritrocito de carnero producido en conejo (Anexo 6), en una dilución 1:10000 para opsonizarlos. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS/BSA 0.1%, se resuspendieron en 500µL, y se contaron. Para los ensayos de fagocitosis, los eritrocitos se añadieron en una relación de 1 célula por 20 eritrocitos, o 1:10, según se indica, para los ensayos de fagocitosis. Para favorecer el contacto entre las células y los eritrocitos, se centrifugaron las células y los glóbulos rojos opsonizados para formar un pellet.

Para que se lleve a cabo la fagocitosis, las células con los eritrocitos fueron incubadas a 37°C, por 30' o 1h, utilizando un control incubado a 4°C, por el mismo periodo de tiempo. Después de la incubación para permitir la fagocitosis, se retiró el medio y se adicionaron 810µL de agua destilada, con el objetivo de lisar los eritrocitos no fagocitados por shock osmótico. Transcurrido 1 minuto, se adicionaron 90µL de PBS 10X para general un ambiente isotónico. Las células fueron centrifugadas, y lavadas con 500µL de PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en 200 µL de PFA/PBS 1%, para su lectura en el citómetro de flujo.

DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA PCR EN TIEMPO REAL

La cuantificación de la expresión de RNAm se llevó a cabo mediante RT-PCR con iniciadores diseñados para FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII, y como gen endógeno HPRT1 (hipoxantina fosforribosiltransferasa 1) (Tabla 1)

Tabla 1. Oligonucleótidos para ensayo de RT-PCR

HPRT	Secuencia	No Bases	Tm (PB)	Tm (PE)	%G/C (PB)	%G/C (PE)	Sec Rec	Exón
Forward	TTATGGACAGGACTGAACGTCTTG	24	59	54.66	46	45.83	292-405	2--3
Reverse	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT	21	58	53.26	48	47.62		
		Amplicón	Amp tm	Amp %GC	Amp Ta	Amp Len	Penalty	
		114	80	51	59	114	325	
FcgRI	Secuencia	No Bases	Tm (PB)	Tm (PE)	%G/C (PB)	%G/C (PE)	Sec Rec	Exón
Forward	GGGCAAGTGGACACCACAA	19	54.62	59	57.89	58	93-175	1--2
Reverse	TGCAAGGTTACGGTTTCCTCTT	22	54.22	59	45.45	45		
		Amplicón (pb)	Amp tm	Amp %GC	Amp Ta	Amp Len	Penalty	
		83	82	54	60	83	168	
FcgRIIa	Secuencia	No Bases	Tm	%G/C	Sec Rec	Exón	Amplicón	
Forward	GGCTTCTGCAGACAGTCAAGC	21	56.05	57.14	137-216	2--3	80 y 77	
Reverse	CCTGGAGCACGTTGATCCAC	20	55.28	60				
FcgRIIb	Secuencia	No Bases	Tm (PB)	Tm (PE)	%G/C (PB)	%G/C (PE)	Sec Rec	Exón
Forward	GCAGTTCCAAAAGAGAAGGTTTCT	24	53.73	58	41.67	42	1156-1252	8
Reverse	TCGGTTATTTGGGACCATATTGT	23	51.89	58	39.13	39		
		Amplicón	Amp tm	Amp %GC	Amp Ta	Amp Len	Penalty	
		97	79	47	58	97	242	
FcgRIII	Secuencia	No Bases	Tm (PB)	Tm (PE)	%G/C (PB)	%G/C (PE)	Sec Rec	Exón
Forward	GGTGCAGCTAGAAGTCCATATCG	23	55.03	59	52.17	52	665-741	4--5
Reverse	GAATAGGGTCTTCCTCCTTGAACA	24	53.75	59	45.83	46		
		Amplicón	Amp tm	Amp %GC	Amp Ta	Amp Len	Penalty	
		77	84	58	61	77	142	

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el programa PrimerExpress, de Applied Biosystems. Con la finalidad de reconocer solo secuencias en RNA mensajero maduro, se utilizó la estrategia de diseñar oligonucleótidos que únicamente reconocieran secuencias que han sido identificadas como exones, para excluir los intrones.

EXTRACCIÓN DE RNA

Macrófagos derivados de monocitos humanos fueron utilizados con el objetivo de estandarizar las condiciones de reacción para el alineamiento de los iniciadores para el PCR tiempo real. Para la extracción de RNA, al paquete celular (5×10^6 células) se le agregó 1mL de TRIzol Reagent (Invitrogen), resuspendiendo por pipeteo para la lisis completa de las células. Se agregaron 200 μ L de cloroformo (99% puro, para biología molecular, Sigma-Aldrich), agitando fuertemente por 15s y se incubó por 3min a temperatura ambiente. Para separar las fases se centrifugó a 11000 xg por 15 min a una temperatura de 4°C (Centrifuge 5810C, Eppendorf).

Se recuperaron 2/3 partes de la fase acuosa, donde se encuentra el RNA, en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5mL y se les adicionaron 500 μ L de isopropanol (99,5% grado HPLC, Sigma-Aldrich) para precipitar el RNA. Se incubó la muestra por 10 min a temperatura ambiente, para después centrifugar a 11000g por 10 min a una temperatura de 4°C.

Después de la centrifugación, se desechó el sobrenadante y se procedió al lavado del pellet, agregando 1mL de etanol al 75%, se agitó en un vortex (Vortex Genie 2) por 15s y se centrifugaron las muestras a 7500 xg por 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se hizo un segundo lavado con etanol al 75%, de igual manera se agitó y se centrifugó. Se desechó el sobrenadante y el botón se dejó secar a temperatura ambiente por unos 15 min aproximadamente o hasta que ya no hubiese gotas de etanol presentes en el tubo o alrededor del botón. Una vez seco, el botón de RNA se disolvió en 50 μ L de agua inyectable.

Se realizó la cuantificación del RNA, con un blanco de agua. Se determinó la absorbancia a tres longitudes de onda, a 260nm (ácidos nucleicos), a 280nm (proteínas) y a 230nm (sales). El cálculo para la concentración de RNA se realiza considerando que una $A_{260}=1$ corresponde a 40 ng/ μ L de RNA, de acuerdo a la ecuación:

$$(Abs\ 260nm)(40ng/\mu L) = RNA [ng/\mu L]$$

La presencia de proteínas y sales pueden interferir en las reacciones posteriores, por lo que para que no haya problemas de interferencia la relación entre la cantidad de RNA y proteínas (A_{260}/A_{280}) debe ser mayor a 1,8 y con respecto a sales la relación (A_{260}/A_{230}) debe ser mayor a 1,7. La calidad del RNA se observó corriendo por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% entre 800ng y 1 μ g de RNA con 3 μ L de buffer de carga para RNA.

La electroforesis se realizó a 90V por 30 min aproximadamente, después de esto se tiñó el gel dejando 15 min en una solución diluida de bromuro de etidio (Fluka, BioChemika) y se observó en luz UV en un transiluminador (Gel Doc 2000, Bio-Rad) con el programa Quantity One. La presencia de dos bandas bien definidas equivalentes al RNA ribosomal (18s y 28s) indican una buena calidad de la muestra, si hubiese un barrido o ninguna banda indicaría que el RNA fue degradado o que se perdió en algún paso de la extracción.

TRATAMIENTO CON DNAasa

Para eliminar la contaminación con DNA genómico que pudiese existir en la extracción de RNA, el RNA es tratado con DNAasa (Turbo DNAasa-free kit, Applied Biosystem). Se adicionó 0.1 volumen de Turbo DNAasa buffer 10X y 1μL de Turbo DNAasa al RNA, agitando suavemente. Se incubó 37°C por 20-30 minutos. Para detener la reacción, se adicionaron 2μL del reactivo para inactivación de la DNAasa, resuspendido con buena agitación, incubándolo por 5 minutos a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente. Se centrifugó a 10,000 xg por 1.5 minutos y se transfirió el RNA a un tubo nuevo. Para evidenciar que el tratamiento con la DNAasa no degradó el RNA se corre un gel de agarosa al 1.5%.

SÍNTESIS DE cDNA

A partir de 1mg de RNA se realizó la síntesis de cDNA con la retrotranscriptasa M-MLV (Promega). En un tubo se colocó el volumen necesario para tener 1μg de RNA, 1μL de Oligo dT12-18 (Invitrogen) y agua-DEPC en un volumen final de 14μL. Se incubó a 70°C por 5 min en el termociclador (Corbett Research, modelo CG1-96) y se colocó en hielo al término de este tiempo por al menos un minuto.

Se prepara una mezcla de 4μL de Buffer 5X, 1μL de dNTPs 10mM (Invitrogen) y 1μL de retrotranscriptasa M-MLV. Las muestras para la reacción se incubaron a 37°C por 60 min y después a 75°C por 15 min en el termociclador. El cDNA de cada muestra se congeló a -20°C hasta su uso en las reacciones posteriores.

PCR EN TIEMPO REAL

Cada mezcla de reacción se preparó con lo siguiente:

Master Mix	5μL
cDNA	1μL
Oligo Forward	0.25μL (250nM)
Oligo Reverse	0.25μL (250nM)
Uracil N-glicosilasa (Applied Biosystems)	0.2μL
H₂O inyectable	3.5μL

Con los siguientes ciclos para la reacción de PCR:

Temperatura	Tiempo	# de ciclos
50°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15 s	50
60°C	1 min	

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR PARA SECUENCIAR

Los fragmentos amplificados por PCR tiempo real están sintetizados con Uracilo en lugar de Timina, por lo cual se tuvo que diseñar una reacción de PCR en punto final, con las siguientes características:

Volumen final 50μL	
10X PCR Buffer s/Mg²⁺	5μL
10X mM dNTPs	1μL
50mM MgCl₂	1.5μL
Oligonucleotidos (10nM)	1.25μL (250nM) (por cada uno)
Taq Polimerasa	0.2μL

Templado	1 μ L
Agua inyectable	40.05 μ L

Llevando a cabo el siguiente protocolo de PCR:

	Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
Incubación	94°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	45 segundos	
Alineamiento	60°C	30 segundos	40
Extensión	72°C	45 segundos	

Los productos de esta PCR punto final, se corrieron en un gel de Agarosa al 2% por 30 min a 90 volts, para visualizar una única banda. Posteriormente se realizó la purificación con el kit QIAquick gel extraction kit.

Se colocaron los 50 μ L de la reacción de PCR y se adicionaron 150 μ L de Buffer QG y 50 μ L de isopropanol, se mezcló perfectamente. Esta mezcla se colocó en la columna, con precaución de adicionar el líquido en el centro de la misma, y se centrifugo por 1 min a 13000 RPM, se eliminó el excedente, y se adicionaron a la columna 500 μ L de Buffer QG por 1 min, posteriormente se centrifugo 1 min a 13000 RPM.

Después de quitar el excedente se adicionaron 750 μ L de buffer PE para lavar la columna, dejando incubar 1 min, al final de la incubación se centrifugo 1 min 13000 RPM.

Para eluir el DNA, se utilizó H₂O grado mili-Q, con un pH de 7.5, la cual se dejó calentar a punto de ebullición, a esta temperatura se adicionó 30 μ L a la columna y se dejó incubar 1 min, finalmente se centrifugo 1 min a 13000 RMP; el líquido se recuperó en un tubo nuevo y se cuantifico la cantidad de DNA en NanoDrop.

Se realizó un gel de Agarosa al 2% para observar una sólo banda, junto a un marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder. Invitrogen).

Estos fragmentos purificados fueron enviados a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, para su secuenciación por el método de Sanger, en un secuenciador de capilar automático.

RESULTADOS

DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS Y POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS

Para la obtención de un modelo *in vitro* que nos permitiese evaluar el efecto de la polarización de macrófagos a cada uno de los tres fenotipos característicos, sobre la expresión de receptores para IgG y la fagocitosis mediada por estos receptores, utilizamos como modelo la línea celular THP-1. Estas células, que provienen de una leucemia monocítica aguda, se encuentran arrestadas en el estadio de monocitos. Para obtener macrófagos a partir de estas células es necesario inducir su diferenciación hacia macrófagos. Los protocolos más utilizados para esto son la activación con VD3 (vitamina D3) o PMA (Daigneault 2010). Para este trabajo usamos células THP-1 derivadas a células tipo macrófago por la incubación con una concentración de 20 nM de PMA, durante 5 días, con dos días más de descanso en un medio libre de PMA.

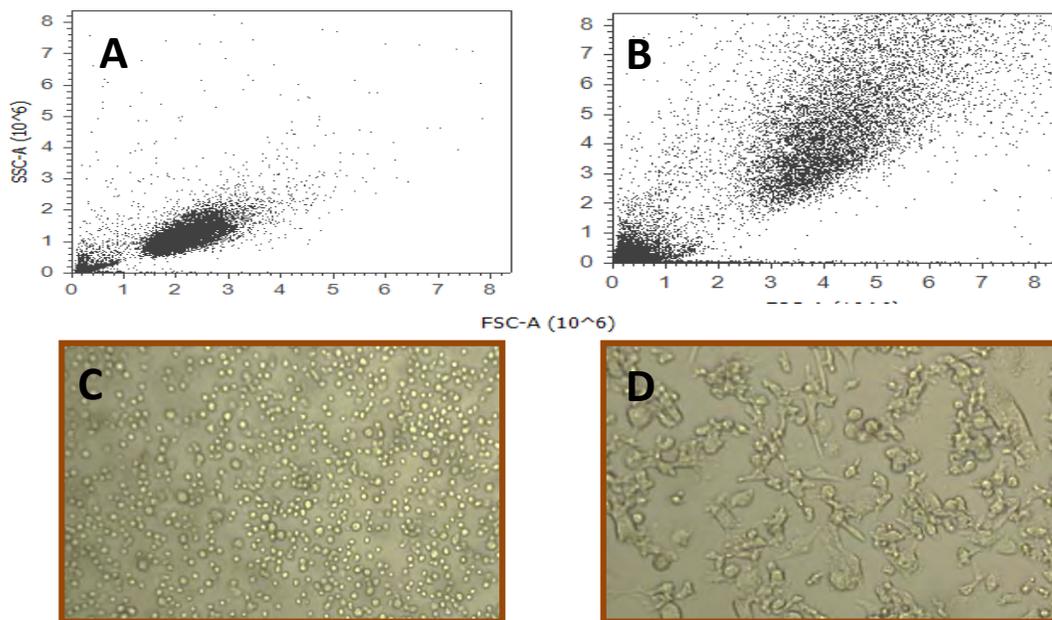


Figura 4. Características morfológicas de las células THP-1 (Mo) y células THP-1 tratadas con PMA (MØ0). Células THP-1 fueron cultivadas con PMA 20nM por 5 días, y 2 días más con medio libre de PMA. Al final de este proceso fueron consideradas como Macrófagos en estadio cero (MØ0). Dot plots de tamaño contra granularidad y microscopía óptica 40X de células THP-1 sin tratamiento (A y C) y células tratadas con PMA (B y D).

Los criterios que se tomaron en cuenta para constatar la diferenciación de las células THP-1 a células con fenotipo de macrófago, incluyeron el tamaño y la morfología de las células. Al igual que los macrófagos diferenciados de monocitos aislados de sangre periférica, las células THP-1 diferenciadas presentaron prolongaciones de la membrana y un aumento en el tamaño, así como en la granularidad, como se observó mediante citometría de flujo (Figura 4).

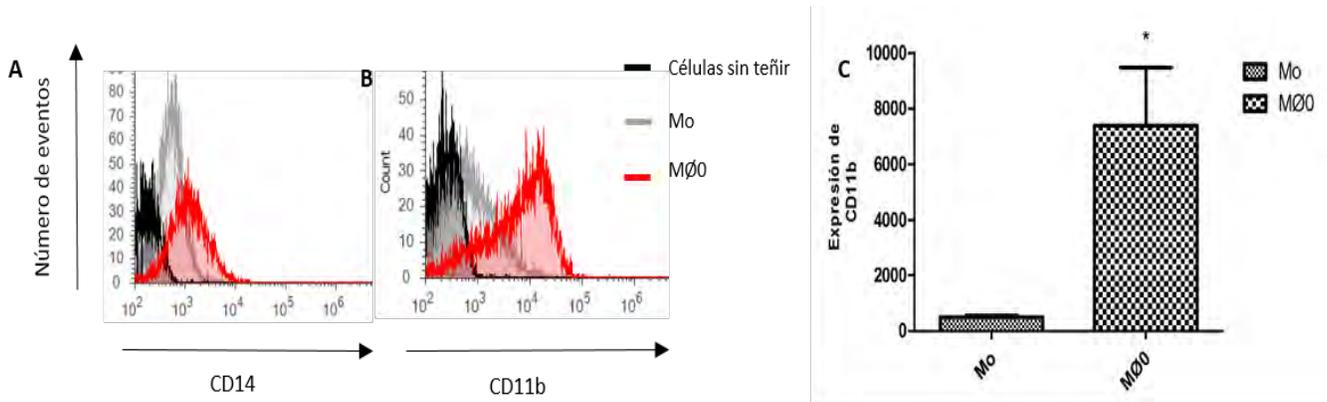


Figura 5. Expresión de CD14 y CD11b durante el proceso de diferenciación. Como criterio de diferenciación se evaluó la expresión de (A) CD14 y (B) CD11b. En la figura se muestran histogramas representativos, donde las líneas grises representan células Mo y las líneas rojas MØ0. (C) Representa el promedio de la media de fluorescencia de la expresión de CD11b de 8 experimentos independientes, las barras de error representan la DE, * $p \leq 0.05$ analizadas con una t-student pareada, comparado con los monocitos.

También se evaluaron, al inicio de la estandarización del proceso de diferenciación, cambios en el nivel de expresión de CD14 y CD11b. No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD14 tras la diferenciación, por lo que se prescindió de este marcador y se consideró a CD11b como indicador del estado de diferenciación de las células (Figura 5 A y B). Para cada uno de los ensayos realizados, se utilizó como criterio de diferenciación el incremento de 300 veces en el nivel de expresión de CD11b en comparación con los monocitos (células THP-1), como se muestra en la Figura 5C.

Para todos los experimentos realizados, las células THP-1 se consideraron monocitos (Mo) y las células THP-1 tratadas con PMA y sin citocinas, como macrófagos no polarizados o en un estadio cero (MØ0) de polarización. Los MØ0 fueron tratados con citocinas por 48h para polarizarlos hacia cada una de las tres subpoblaciones propuestas: el tratamiento con IL-4

(40ng/mL) induce el fenotipo de macrófagos reparadores de tejido (MØrep), el tratamiento con IL-10 (20ng/mL) induce el fenotipo de macrófagos reguladores (MØreg), y las células tratadas con INF γ (30ng/mL) adquieren el fenotipo de macrófagos inflamatorios (MØinf).

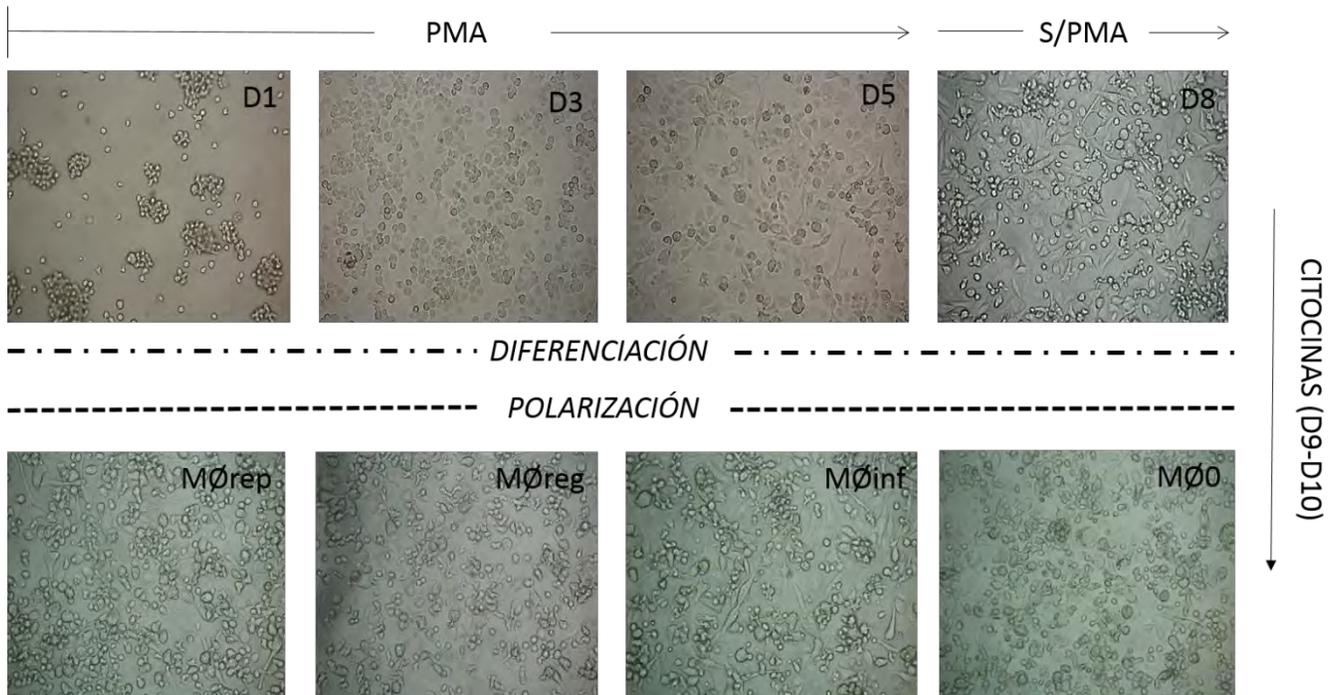


Figura 6. Cambios morfológicos durante el proceso de diferenciación y polarización. Células THP-1 fueron tratadas por 5 días (D1-D5) con PMA (20nM), seguidos de tres días (D6-D8) sin PMA, en medio RPMI 10%. Finalmente en el día 9 y 10 (D9-D10), las células fueron tratadas con citocinas para inducir su polarización. Los macrófagos reparadores de tejido (MØrep) se obtuvieron al tratar con 40ng/mL de IL-4; macrófagos reguladores (MØreg) fueron obtenidos tras el tratamiento con 20ng/mL de IL10, y los macrófagos inflamatorios (MØ) se indujeron tras el tratamiento con 30ng/mL de INF γ . Células que no fueron estimuladas con citocinas fueron consideradas como macrófagos en estadio 0 (MØØ).

Cuando las células fueron polarizadas por el tratamiento con citocinas, los cambios morfológicos fueron menos evidentes que durante el proceso de diferenciación (Figura 6). Las diferencias morfológicas más notorias fueron en las células tratadas con INF γ , las cuales tienden a adherirse con mayor fuerza a la caja de cultivo y se observan con prolongaciones citoplásmicas más numerosas y largas. En el caso de los MØrep y MØreg, no se observan diferencias con relación a los MØØ.

EXPRESIÓN DE CD206, CD163 Y CD80

Se ha reportado que durante la polarización de los macrófagos inducida por citocinas o productos microbianos, hay una modulación de la expresión de diversas moléculas de membrana, algunas de las cuales son características de cierto tipo de polarización y pueden usarse para evaluar el estado de polarización. Dentro de éstas, elegimos como marcadores para monitorear el estado de polarización de las células los siguientes: CD206 (receptor de manosa) para MØrep, CD163 (receptor scavenger) para MØreg y CD80 (molécula coestimuladora) para MØinf (Ambarus 2011). La expresión de estos tres marcadores en la población se determinó mediante una tinción triple, para evaluar el fenotipo de polarización inducido por cada uno de los tratamientos.

En la Figura 7A se muestran los histogramas obtenidos tras el proceso de polarización en un experimento representativo. Los monocitos (no mostrado) y los MØ0, no expresan ninguna de las moléculas estudiadas. La activación con IL-10 induce de manera específica un aumento de 4 veces la IMF en la expresión de CD163, con respecto a MØ0. Por su parte se observa con el tratamiento de INFγ un aumento en la expresión de CD80, con un valor de fluorescencia 5 veces mayor que las otras condiciones experimentales. Estas diferencias son estadísticamente significativas (Figura 7B), cuando se analiza la expresión de estos marcadores en 5 experimentos independientes. Los histogramas muestran que el aumento de la expresión de CD163 y CD80 se presenta de forma homogénea en los MØreg y MØinf, respectivamente, lo que nos permitió concluir que tenemos una población homogénea de estas células. Al mismo tiempo, fue evidente que la expresión de estos receptores es específica para cada subpoblación, permitiendo así tener fenotipos de polarización mutuamente excluyentes.

Con lo que respecta a las células que fueron tratadas con IL-4, no se observa ningún cambio en la expresión de CD206, pero tampoco en la expresión de los otros marcadores empleados. A pesar de ser un marcador muy utilizado para la caracterización de macrófagos reparadores de tejido, en modelos murinos y humanos, en nuestro diseño experimental no fue posible inducir

el aumento en la expresión de este receptor. Esto indica que, con respecto a la expresión de estos tres receptores, las células tratadas con IL-4 son iguales que los MØ0, ya que no se detectaron cambios en la expresión de ninguno de los tres receptores (Figura 7A).

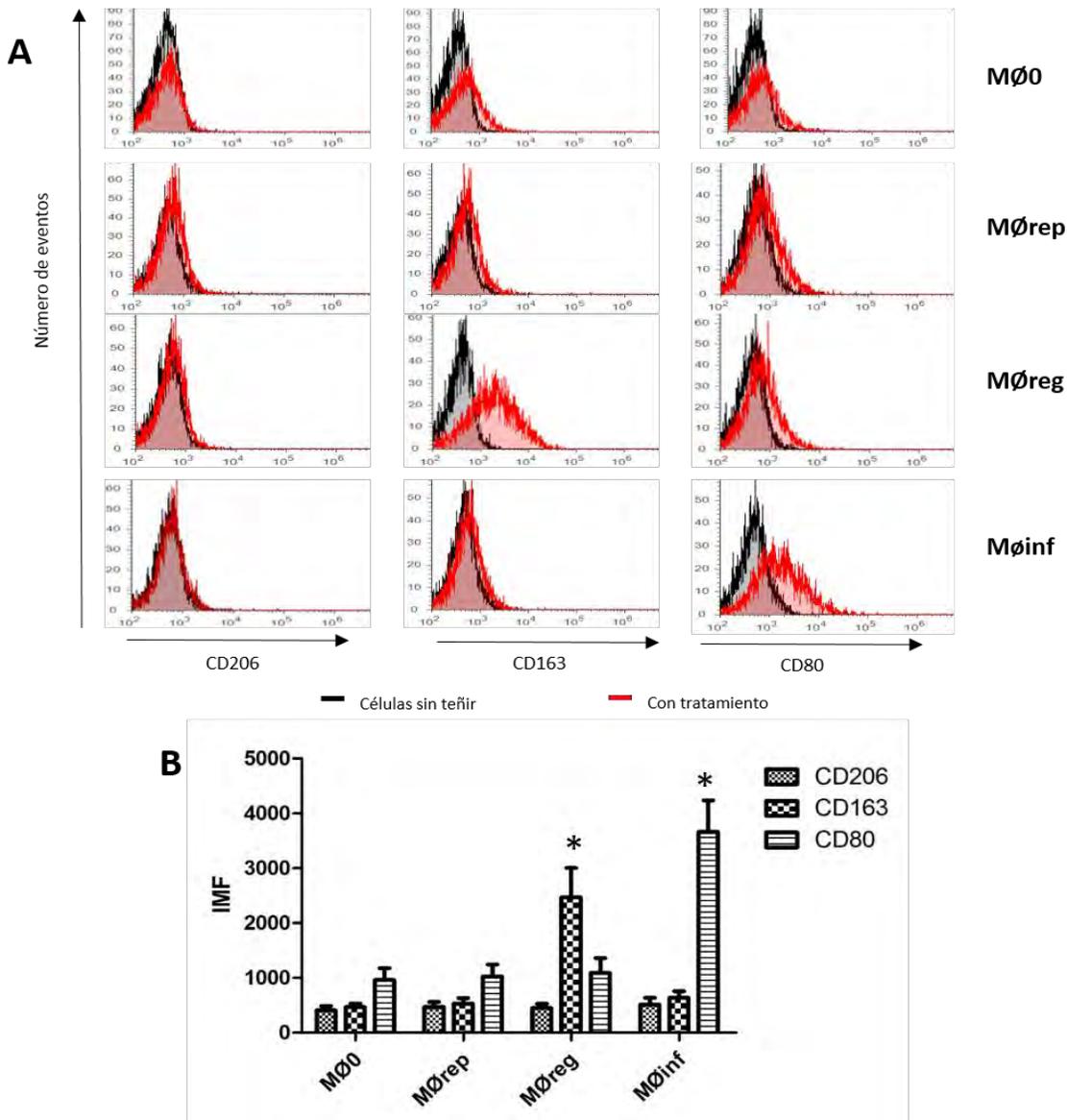


Figura 7. Expresión de DC206, CD163 y CD80 en macrófagos con diferentes estados de polarización. Después de 48 horas de tratamiento con las citocinas correspondientes, las células fueron incubadas con anticuerpos anti-CD206-FITC, anti-CD163-PE y anti-CD80-APC en una tinción triple, y fueron analizadas por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos; las líneas negras representan células sin teñir, y las líneas rojas las células tratadas con cada una de las citocinas (A), la media de fluorescencia promedio para cada uno de los marcadores (B), n=5, *p<0.05, ANOVA con Tukey.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN MACRÓFAGOS POLARIZADOS

Una vez que se establecieron las condiciones para polarizar los MØ a cada una de las subpoblaciones deseadas, nuestro objetivo fue determinar si había cambios en la expresión en membrana de los receptores para la fracción constante de los anticuerpos del isotipo IgG (FcγRs). Para ello se siguieron dos estrategias de tinción; inicialmente se determinó la expresión en la membrana de los receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII, mediante anticuerpos específicos para la porción extracelular de cada uno de ellos. Sin embargo, el anticuerpo específico para la porción extracelular del FcγRII reconoce las dos isoformas del receptor (a y b). Por tanto, para determinar los cambios en la expresión de cada isoforma, se usaron anticuerpos específicos para las porciones intracelulares de los receptores (el FcγRIIa contiene un motivo ITAM a diferencia de FcγRIIb, el cual contiene un motivo ITIM).

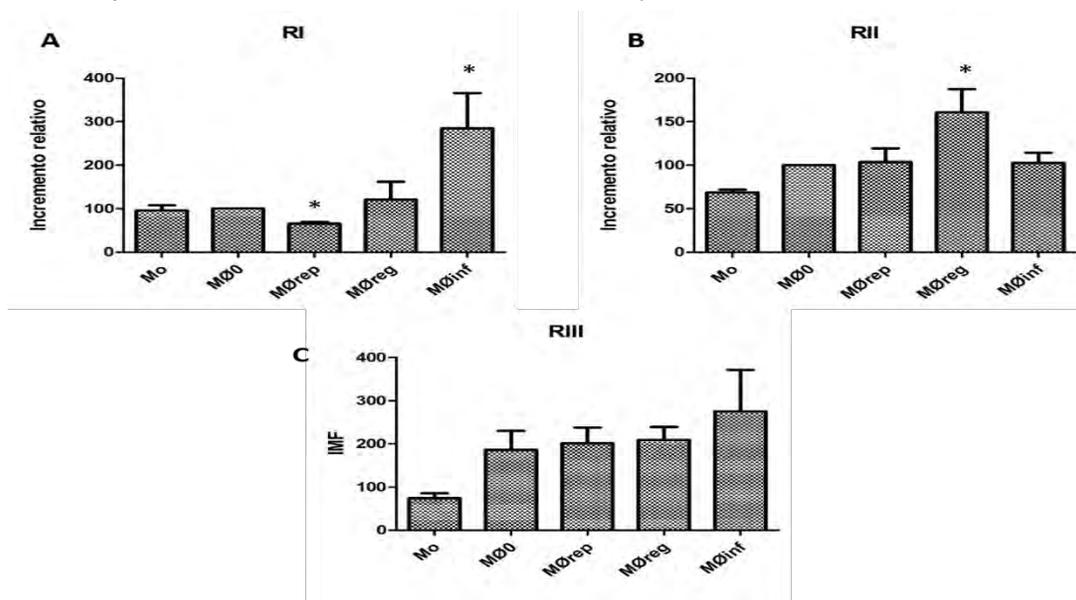


Figura 8. Efecto de la polarización en la expresión en membrana de FcγRI, FcγRII, FcγRIII. Después de la polarización se determinó la expresión en membrana de (A) FcγRI y (B) FcγRII con una tinción indirecta; utilizando como anticuerpos primarios el mAb 32.2 para FcγRI y el mAb IV.3 para FcγRII; como anticuerpo secundario un anticuerpo Anti-ratón FITC (Zymed 81-6511); (C) FcγRIII es una tinción directa con anti-CD16 FITC, determinados por citometría de flujo. Los datos muestran el promedio de n=5, las barras de error representan la DE, *p≤0.05 analizadas con un ANOVA y una prueba *a posteriori* (Tuckey), por la comparación de las células tratadas con respecto a los MØ0.

La expresión de FcγRI es significativamente mayor en los MØinf, con relación a los otros estados de polarización, este aumento es de 3 veces comparado con cualquier condición (Figura 8). Por el contrario, hay una disminución estadísticamente significativa del 20% en la expresión de este receptor en MØrep, lo cual es diferente a lo observado para las células en estadio de monocito. Los MØreg mantienen la misma expresión de FcγRI que los MØ en estadio cero.

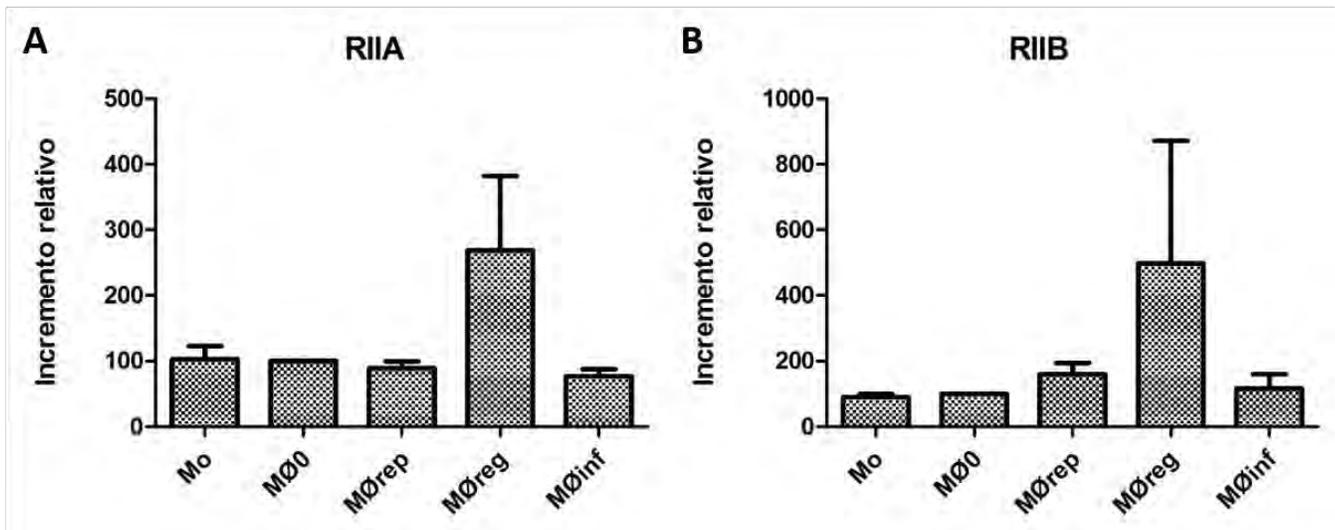


Figura 9. Cambios en la expresión de FcγRIIA y FcγRIIB tras la polarización de macrófagos determinados por citometría de flujo. Cada una de las poblaciones de macrófagos, o monocitos, fueron permeabilizados para detectar la expresión de (A) FcγRIIA y (B) FcγRIIB intracelularmente, utilizando como anticuerpos primarios la clona CD32-A, N-20 para FcγRIIA y la clona CD32-B, C-20 para FcγRIIB; como control de isotipo un anti-ratón AP, y como anticuerpo secundario un Anti-cabra FITC. Los datos muestran el promedio de n=4, las barras de error representan la DE, *p<0.05 analizadas con un ANOVA y una prueba *a posteriori* (Tuckey), por la comparación de las células tratadas con respecto a los MØ0.

Con relación a lo observado en la expresión de FcγRII, los MØreg incrementan el 50% la expresión de este receptor, en comparación con los otros estados de polarización (Figura 8). En los histogramas se observan dos picos, lo cual nos indica una población heterogénea, se observan dos poblaciones con diferente nivel de expresión de FcγRII (Anexo 1). Al analizar de forma independiente los cambios que presentan los niveles de expresión de la isoforma activadora (FcγRIIA) y la isoforma inhibitoria (FcγRIIB) (Figura 9), los MØreg muestran una mayor expresión de ambas isoformas, con un aumento mayor de la isoforma inhibitoria con

relación a la activadora. El nivel de expresión de la forma activadora es mayor en los MØreg que en cualquier otro estado de polarización. La expresión de FcγRIIa modifica su nivel en membrana sólo en presencia de IL-10 (200% más), tanto los monocitos como los MØ0 y los estados de polarización de MØrep y MØinf, mantienen sin cambio la expresión de esta isoforma. A pesar de que la modulación en la expresión de FcγRIIa y FcγRIIb no fue estadísticamente significativa, se observó que el tratamiento con IL-4 (que polariza a MØrep) lleva a un ligero incremento en la expresión de FcγRIIb. Esta diferencia apoya la idea de que los MØrep en efecto constituyen una población diferente a los MØ0, en los cuales no se observó este cambio.

Finalmente, el análisis de la expresión de FcγRIII muestra que este receptor es pobremente expresado en células THP-1 (monocitos). Después del proceso de diferenciación y polarización, todas las condiciones muestran un ligero aumento en la expresión de FcγRIII (Figura 8); sin embargo, debemos hacer notar que los valores de media de fluorescencia manejados son muy bajos, y a pesar de que hay una diferencia con respecto a las células sin teñir, los cambios en la expresión de membrana de FcγRIII no son estadísticamente significativos (Anexo 1). Para tener una visión más completa del efecto de la polarización en la expresión de FcγRs se analizaron posibles cambios en la expresión del RNA mensajeros para estos receptores.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RNAm PARA FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII POR RT-PCR EN MACRÓFAGOS POLARIZADOS

La expresión de una proteína funcional es regulada a diferentes niveles, desde mecanismos epigenéticos, regulación de la transcripción del RNA mensajero que codifica para dicha proteína, regulación por modificaciones postraduccionales, entre otras. Con base a lo anterior, quisimos determinar si los cambios en la expresión en membrana de los receptores para IgG observados en células polarizadas, coincidían con cambios en los niveles de los RNA mensajeros para cada uno de los receptores. Los posibles cambios en los niveles de RNA mensajeros de los receptores Fcγ se evaluaron mediante PCR en tiempo real.

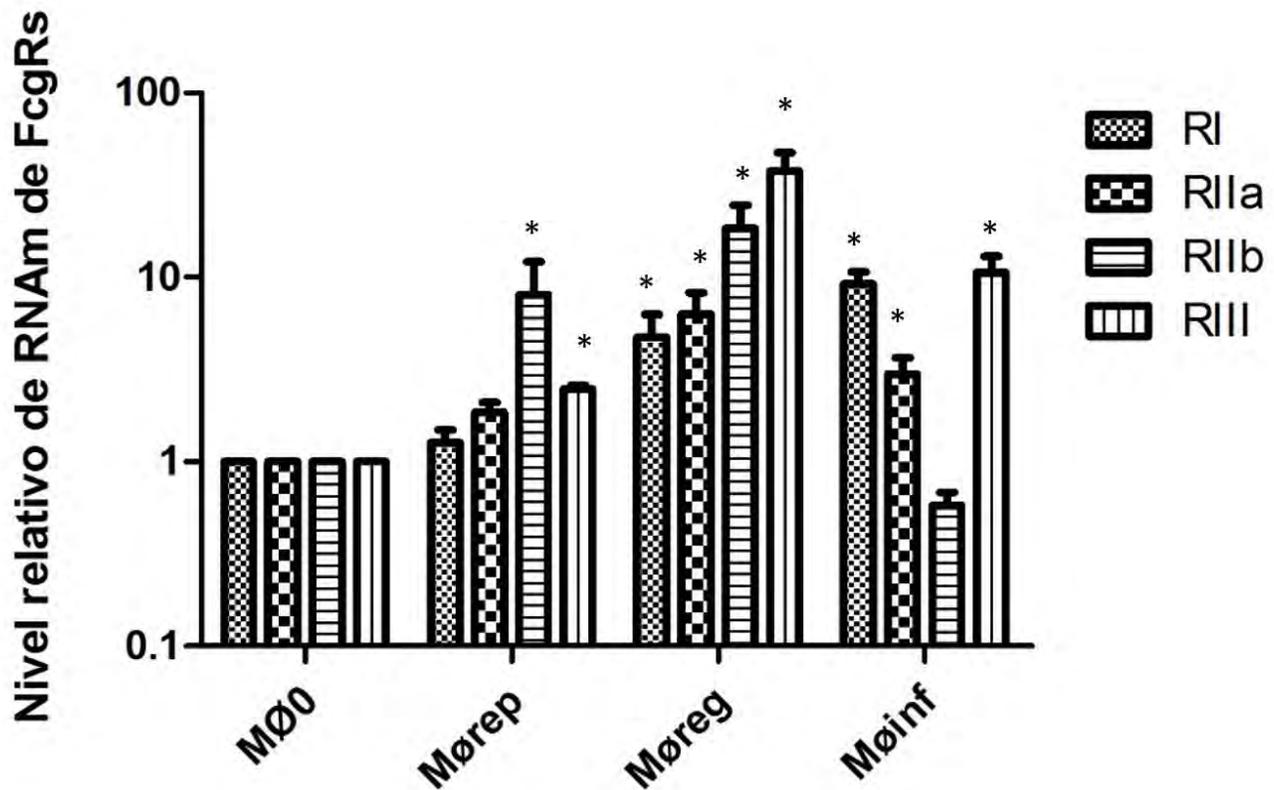


Figura 10. La polarización de macrófagos induce cambios en la expresión relativa del RNAm de FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII. Después de 48h de tratamiento con las citocinas, las células fueron recolectadas para la extracción de RNA total. La expresión relativa del RNAm se determinó por RT-PCR cuantitativa con SYBR Green, usando HPRT como control endógeno; los niveles de RNAm en cada condición se muestran relativos al nivel encontrado en los MØØ. La grafica muestra la expresión relativa promedio de cuatro experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. * $p < 0.05$ analizadas con una t-student pareada.

Una vez determinadas la eficiencia de reacción para cada par de oligonucleótidos utilizados, así como habiendo validado el método de $\Delta\Delta C_t$ para el gen endógeno utilizado (HPRT) y los genes de interés (Anexos 2 y 3), se determinaron los cambios relativos en los niveles de RNAm de cada uno de los tipos de FcγRs, con relación a la expresión observada en los macrófagos en estadio cero.

Los resultados (Figura 10) muestran que a cada estado de polarización corresponde un patrón diferente de expresión de los receptores Fcγ. Para el caso de los MØrep hay un aumento en la expresión de FcγRIIb en comparación con los otros receptores evaluados, la expresión de

RNAm para esta isoforma es 8 veces mayor a la expresión observada en los MØ0, esta diferencia es estadísticamente significativa. Los FcγRI, FcγRIIa y FcγRIII muestran aumentos de menor magnitud, el aumento del RNAm para el FcγRIII mostró significancia estadística, aunque su aumento es menor al observado para los otros dos estados de polarización. En vista de que el principal aumento es en el FcγRIIb, este perfil podría ser clasificado como un perfil inhibitorio.

Los macrófagos reguladores son los que muestran mayores cambios en los niveles de expresión de los RNAm de los receptores, y se observa un incremento estadísticamente significativo para cada uno de los receptores. El mayor cambio relativo es el del FcγRIII, que aumenta 37 veces, seguido del FcγRIIb con un aumento de 18 veces. En correspondencia con lo observado para la expresión en membrana, en estos macrófagos hay un claro aumento en la expresión del mensajero de FcγRIIa, el cual es mayor al aumento observado para esta isoforma en los otros dos estados de polarización. Considerando los aumentos tanto en los receptores activadores (FcγRIIa y FcγRIII) como en el inhibitorio (FcγRIIb) podemos clasificar a este perfil de expresión como mixto.

En el caso de los MØinf, se observa un aumento en la expresión de todas las subclases activadoras de receptores FcγRs. Similar a lo observado por citometría de flujo, en este caso el aumento del mensajero para FcγRI es 2 veces mayor que en los MØreg. Por otro lado, se observa una disminución de 2 veces en la expresión del receptor inhibitorio, lo que no se había identificado por citometría de flujo. En vista del aumento en la expresión de los receptores activadores y la disminución del receptor inhibitorio, el perfil de los macrófagos inflamatorios sería activador.

Mediante PCR cuantitativa pudimos observar que desde el proceso de diferenciación, hay un aumento en la expresión del mensajero de FcγRIII (datos no mostrados), además de que hay una clara modulación positiva de la expresión de este receptor en los MØreg y MØinf, lo cual no había sido detectada al evaluar diferencias en la expresión en membrana de la proteína.

SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR PUNTO FINAL

Para asegurar la amplificación de los productos de PCR de nuestro interés, se diseñó un PCR punto final para obtener amplificadores para ser secuenciados por el Método de Sanger. En la figura 11 se muestra un gel de agarosa que indica la presencia de un solo amplificado en la reacción, así como el peso molecular de los productos de PCR, los cuales coinciden con el peso teórico esperado, el cual oscilaba alrededor de los 100kDa para los cuatro amplificadores, esto para cada uno de los genes de interés.

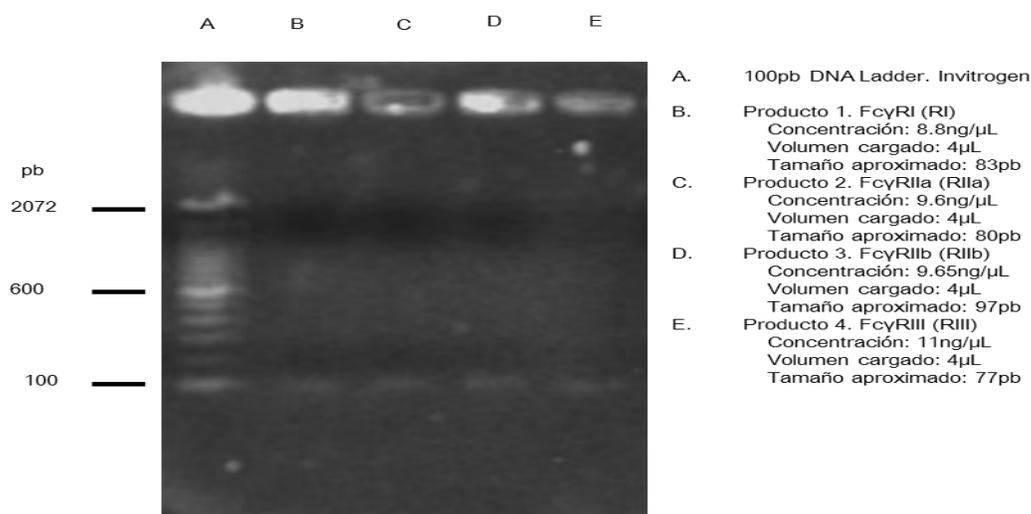


Figura 11. Gel de agarosa al 2% de los productos de PCR punto final purificados con el kit QIAquick Gel Extracción kit (QIAGEN). Los oligonucleótidos diseñados para la determinación por tiempo real, se utilizaron como oligonucleótidos de anclaje para la secuenciación de los productos específicos. Cada par de oligonucleótidos amplifica sólo un fragmento de DNA con un peso aproximado de 100kDa.

La secuenciación por el Método de Sanger, se llevó a cabo utilizando el oligonucleótido “forward” como anclaje, los resultados obtenidos son presentados en la Tabla 4; debemos tomar en cuenta que se evalúa el amplificado posterior a las bases que ocupa el oligonucleótido de anclaje.

Tabla 2. Secuencias de reconocimiento determinadas por el diseño de los oligonucleótidos con ayuda del programa Primer Express, en comparación con las secuencias obtenidas tras la secuenciación mediante el método de Sanger.

	Secuencia de reconocimiento de los oligonucleotidos por Primer Express	Secuencia obtenida por el Método de Sanger
FcγRI	<u>gggcaagt ggacaccaca aaggcag</u> [tga tcactttgca gcctccatgg gtcagcgtgt <u>tccaagagga aaccgtaacc</u> <u>ttgca</u>]	Nnncntga tcactttgca gcctccatgg gtcagcgtgt tcnagagga aaccgtaacc ttgcaa
FcγRIIa	<u>ggct tctgcagaca gtcaagctgc tccccaaag</u> gctgtgctga aactgagcc <u>cccgtggatc aacgtgctcc</u> <u>agg</u>	Se reconocieron dos secuencias, suponemos dos variantes del mensajero de 80 y 77pb
FcγRIIb	<u>gc agttccaaaa gagaaggttt ctccagagt catctacc</u> [tg agtctgaag ctccctgtcc <u>tgaaagccac agacaatatg</u> <u>gtcccaaata accga</u>]	ncnagngt catctacctg agtctgaag ctccctgtcc tgaaagccac agacaatatg gtcccaaata accgaan
FcγRIII	<u>ggtgcag ctagaagtcc atatcgg</u> [ctg gctgttgctc caggcccctc <u>ggtgggtgtt caaggaggaa gaccctattc</u>]	nnctg gctgttgctc caggcccctc ggtgggtgtt ca--ggaggaa gaccctattc annnnnn

La extracción del RNA utilizado para la secuenciación fue hecha de macrófagos derivados de monocitos humanos, debido a que en estos se encuentra una expresión más alta de los receptores FcγRIIb y FcγRIII que en células THP-1, por lo cual se pudo observar la expresión de más de una variante de los genes de interés. En el caso del diseño de los oligonucleótidos para la identificación de FcγRIIa, sabíamos que podrían amplificarse dos variantes del transcrito reportadas en la base de datos de NCBI, una de 80pb que corresponde la variante 1, y una más de 77pb la cual corresponde a la variante 2. En el ferograma (anexo 4) se puede observar que hay dos secuencias traslapadas, por lo cual no se puede definir la composición de bases nitrogenadas de ese producto de PCR.

Para el caso de los otros tres amplificados, se hizo la identificación del 100% de la secuencia, tomando en consideración que las primeras bases que se encuentran contiguas al oligonucleótido que se usa como ancla, no pueden ser definidas por la naturaleza de la propia

metodología. Con base a lo anterior, podemos tener la certeza de estar amplificando específicamente los transcritos de interés.

DIFERENCIAS EN LA CAPACIDAD FAGOCITICA DE MONOCITOS, MACRÓFAGOS CERO Y MACRÓFAGOS POLARIZADOS

Una vez caracterizada la expresión de los marcadores de polarización, así como la expresión del RNA mensajero de los receptores Fcγ y la expresión en membrana de estos mismos, se procedió a evaluar cómo influencia el estado de polarización la capacidad fagocítica de estas células, específicamente la fagocitosis mediada por los receptores para Fcγ. Como partícula fagocítica se utilizaron eritrocitos de carnero opsonizados con anticuerpos anti-eritrocito de carnero. Los anticuerpos anti-eritrocitos provienen de un suero policlonal obtenido de un conejo hiperinmune, por lo que los anticuerpos anti-eritrocitos pertenecen principalmente al isotipo IgG.

Después del tratamiento de las células con las citocinas correspondientes para polarizar a macrófagos inflamatorios (30ng/mL de INFγ), macrófagos reguladores (20ng/mL IL-10) (Frausto-Del-Río 2012) y macrófagos reparadores de tejido (40ng/mL de IL-4), las células se incubaron por 1 hora con eritrocitos opsonizados con IgG y marcados con CFSE, en una relación 1:10 (células:eritrocitos). Posteriormente, los eritrocitos no internalizados se eliminaron mediante un shock hipo-osmótico, y se evaluó por citometría de flujo la fluorescencia asociada a las células (media de fluorescencia) y el porcentaje de la población que fagocitó alguna partícula. Con el producto de estas dos variables se obtuvo el índice fagocítico, el cual es una medida de la capacidad fagocítica de la población celular.

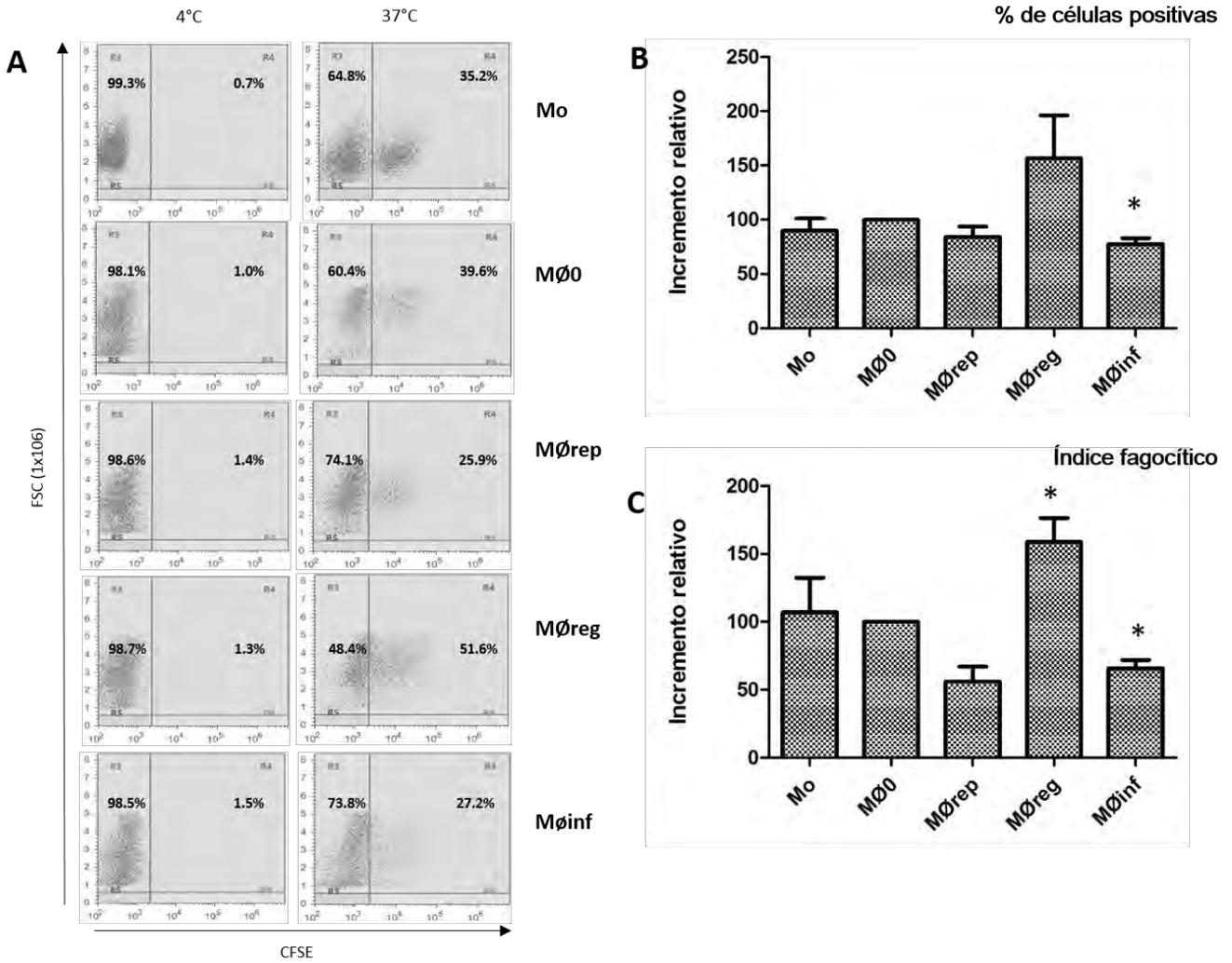


Figura 12. Capacidad fagocítica de los macrófagos bajo diferentes estados de polarización. MØ0 fueron tratados por 48h con IL-10 (20ng/mL), INFγ (300ng/mL), ó IL-4 (40ng/mL). Las células polarizadas fueron cosechadas e incubadas con globulos rojos de canero teñidos con CFSE y opsonizados con un anticuerpo policlonal de conejo, en una relación de 1 célula por 10 eritrocitos. Los eritrocitos no internalizados fueron lisados tras 1 hora de incubación y la fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. (A) Graficas de puntos de fluorescencia contra dispersión (Density Plots) de un experimento representativo. (B) Media del porcentaje de células positivas para CFSE, y (C) Media del Índice fagocítico, calculado como % de células positivas por Intensidad Media de Fluorescencia. Los datos muestran el promedio de n=5, las barras de error representan la DE, *p≤0.05 analizadas con un ANOVA y una prueba *a posteriori* (Tukey), para la comparación de las células tratadas con respecto a los MØ0.

Los monocitos y los MØ0 mostraron una capacidad fagocítica muy similar (Figura 12), lo cual no era esperado en vista de que en el caso de células primarias, los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana muestran una mayor capacidad para fagocitar partículas opsonizadas que los monocitos recién aislados.

El efecto más significativo se observa en las células tratadas con IL-10 en los que, como se muestra en las gráficas de puntos (Figura 12A) hay una mayor proporción de células que fueron capaces de fagocitar, y también la fluorescencia de las células se ve aumentada, observando que la nube de células positivas para CFSE se desplaza medio logaritmo a la derecha, con relación a los MØ0. El porcentaje de células que son capaces de fagocitar aumenta un 10% en comparación a las macrófagos sin citocinas; sin embargo, es su capacidad de ingerir un mayor número de eritrocitos, lo que contribuye al aumento en la IMF, y que es considerado para obtener el índice fagocito, permite que estas células sean significativamente más eficientes en fagocitar partículas que los MØ0 (Figura 12C).

Tanto los MØrep como los MØinf, presentan una capacidad fagocítica disminuida en relación a los MØ0; el porcentaje de células positivas en ambos estados de polarización disminuye aproximadamente un 14% con relación a los macrófagos sin citocinas (Figura 12B). Esta diferencia es sólo estadísticamente significativa para los macrófagos inflamatorios. Por otra parte, podemos observar que el número de partículas que los MØinf son capaces de fagocitar es menor, lo cual se refleja en que los valores de fluorescencia de las células positivas son menores a los valores de fluorescencia de las células positivas para los MØ0 y los MØrep. Cuando se comparan los índices fagocíticos (Figura 12 C), los MØinf muestran una diferencia significativa en su capacidad fagocítica que es un 24% menor en relación a los MØ0. Los MØrep muestran también una capacidad fagocítica disminuida; sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa (Figura 12C).

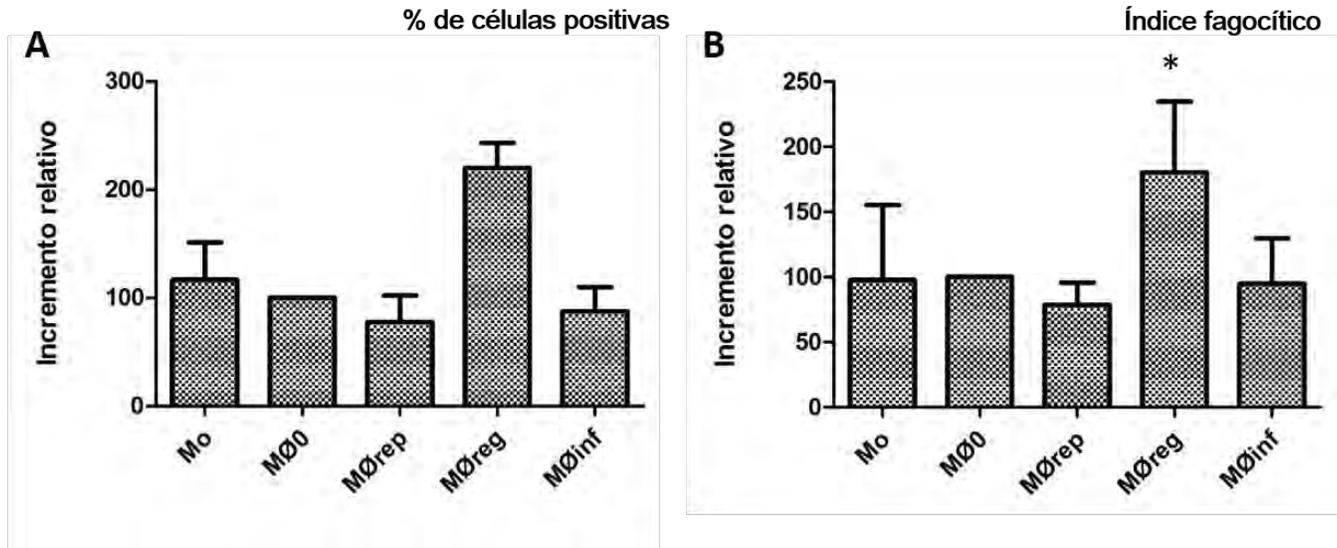


Figura 13. Influencia del tiempo de incubación sobre la fagocitosis de eritrocitos de carnero opsonizados. MØØ fueron tratados 48h con IL-10 (20ng/mL), INF γ (300ng/mL) o IL-4 (40ng/mL). Las células polarizadas fueron cosechadas e incubadas con globulos rojos de carnero teñidos con CFSE y opsonizados con un anticuerpo policlonal anti-eritrocitos, en una relación de 1 células por 20 eritrocitos. Los eritrocitos no internalizados fueron lisados tras 30 minutos de incubación y la fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. (A) Media del porcentaje de células positivas para CFSE, y (B) Media del Índice fagocítico, calculado como % de células positivas por Intensidad Media de Fluorescencia. Los datos muestran el promedio de n=3, las barras de error representan la DE, *p \leq 0.05 analizadas con un ANOVA y una prueba *a posteriori* (Tukey), por la comparación de las células tratadas con respecto a los MØØ.

Durante la estandarización de las condiciones idóneas para la fagocitosis de eritrocitos de carnero, encontramos que diferentes factores afectaban la evaluación de la capacidad fagocítica de los macrófagos polarizados. Uno de estos factores fue el tiempo de fagocitosis (Figura 13). Cuando permanecieron en contacto las células con la partícula fagocítica por únicamente 30 minutos, se podía observar claramente que los MØreg fueron más eficientes para fagocitar, evaluando el porcentaje de células fagocíticas, así como si se considera la intensidad media de fluorescencia. Por otro lado, a pesar de que a este tiempo de incubación se puede observar una tendencia de los MØinf a mostrar una menor capacidad fagocítica, las diferencias con respecto a los MØØ no eran estadísticamente significativas. Esto nos llevó a pensar que se requería un mayor tiempo de contacto de las células con la partícula fagocítica, para observar cambios mas

evidentes en la capacidad fagocítica. Debido a esto se evaluó la fagocitosis después de 1 hora de incubación (Figura 12 y Figura 14).

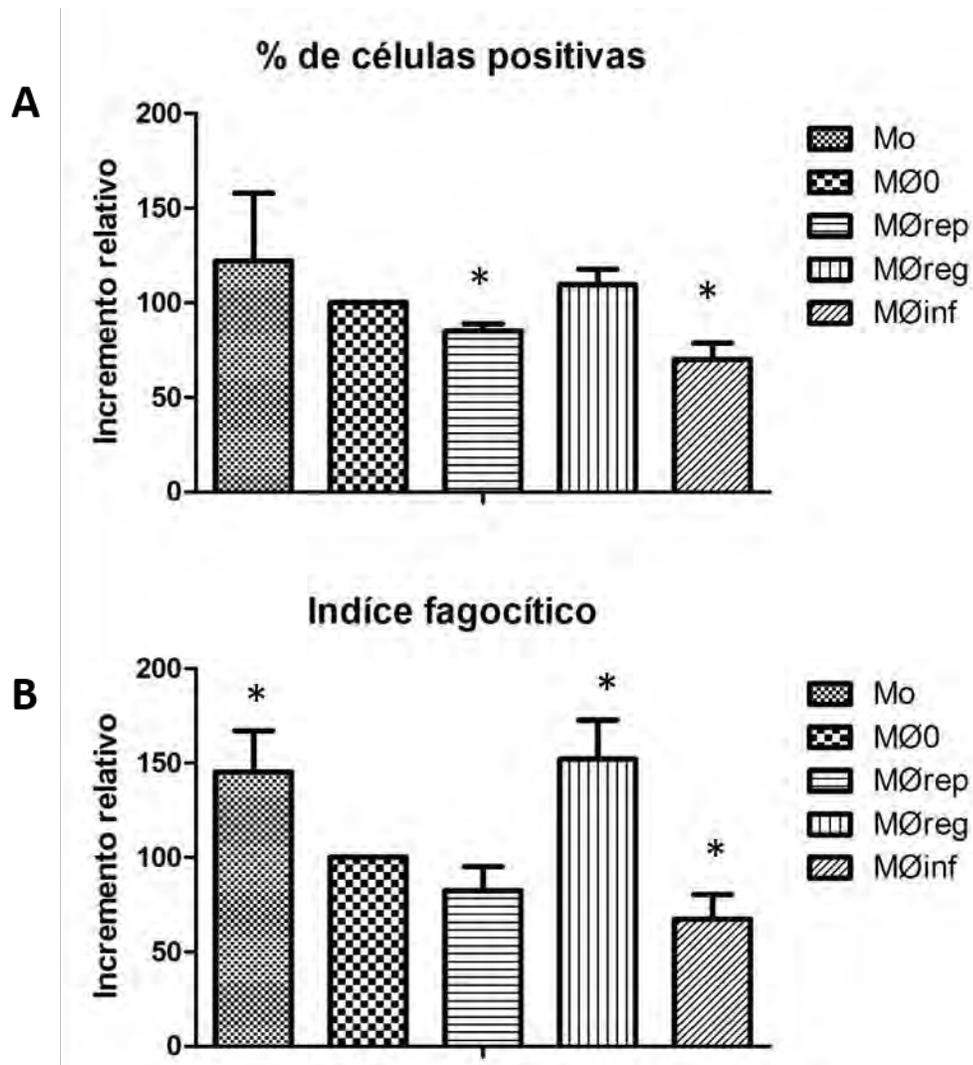


Figura 14. Influencia de la cantidad relativa de blancos fagocíticos en la capacidad fagocítica de macrófagos polarizados. MØ0 fueron tratados 48h con IL-10 (20ng/mL), INF γ (300ng/mL) o IL-4 (40ng/mL). Las células polarizadas fueron cosechadas e incubadas con globulos rojos de carnero teñidos con CFSE y opsonizados con anticuerpos policlonales anti-eritrocitos, en una relación de 1 células por 20 eritrocitos. Los eritrocitos no internalizados fueron lisados tras 1 hora de incubación y la fagocitosis fue evaluada por citometría de flujo. (A) Media del porcentaje de células positivas para CFSE, y (B) Media del Índice fagocítico, calculado como % de células positivas por Intensidad Media de Fluorescencia. Los datos muestran el promedio de n=5, las barras de error representan la DE, *p \leq 0.05 analizadas con un ANOVA y una prueba *a posteriori* (Tukey), por la comparación de las células tratadas con respecto a los MØ0.

Otro de los factores que resultó ser importante en la evaluación de la capacidad fagocítica de los macrófagos polarizados fue la proporción de células en relación a los eritrocitos. El planteamiento de este diseño experimental se basaba en la idea de que al restringir el número de partículas fagocitables (blancos fagocíticos) por célula, podrían hacerse más evidentes las posibles diferencias en la capacidad fagocítica. Al evaluar la fagocitosis en una proporción de 1:20 (células:eritrocitos), el patrón observado de la fagocitosis cambia (comparar Figura 12 y Figura 14).

Por una parte, usando la relación 1:20 los monocitos mostraron una mayor capacidad fagocítica (Figura 14B) con relación a los macrófagos en estadio cero, en esta condición el porcentaje de fagocitosis de los monocitos es similar al registrado por los MØreg. Estas condiciones parecen ser saturantes para los macrófagos reguladores, en la Figura 14A se muestra como se pierden las diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para CFSE, en contraste con lo observado en una fagocitosis donde se restringe la partícula fagocítica (relación 1:10, Figura 12B). Sin embargo, al evaluar el índice fagocítico en ambas condiciones, los MØreg sólo son capaces de incrementar su fagocitosis 50% más que los MØ0.

La estrategia de restringir la partícula fagocítica resultó ser más útil para resaltar las diferencias cuando la capacidad fagocítica se ve disminuida. La disminuída capacidad fagocítica de los MØrep se hizo más evidente: en el índice fagocítico, realizando el experimento en una relación 1:10 se obtiene una disminución de aproximadamente el 45%, mientras que cuando se utiliza una relación 1:20 la disminución es solo del 18% con relación a los MØ0. De cualquier modo, aunque el porcentaje de disminución es distinto, en ninguna de ambas condiciones experimentales la disminución de la fagocitosis en los MØrep fue estadísticamente significativa. Por su parte, para los MØinf no hay una diferencia notable en la disminución de la fagocitosis cuando el experimento se realiza en una relación 1:10 (disminución del 35%) o usando una relación 1:20 (33%) (Figuras 12C y 14B).

DISCUSIÓN

Cada una de las células del sistema inmune lleva a cabo funciones específicas y coordinadas en torno a la homeostasia, activación o regulación del sistema inmunológico. Estas funciones son determinadas por las capacidades y fenotipo que la células posea. Un ejemplo son los linfocitos T CD4+, estos están bien caracterizados como células secretoras de citocinas, sin embargo, estudios más detallados han llevado a determinar que este linaje celular es más diversificado, inicialmente se caracterizaron las células Th1 y Th2, progresivamente se les han ido sumando células T con fenotipos distintos, como los linfocitos Th17, Th9, Treg, entre otras (Kawachi 2013); cada una de estas células lleva a cabo procesos independientes, aunque tienen en común el ser células primordialmente productoras de citocinas. Este fenómeno de especialización observado en células de la inmunidad adaptativa, se ha caracterizado recientemente en células de la inmunidad innata como los macrófagos.

Los macrófagos, células consideradas de la inmunidad innata, tienen gran capacidad fagocítica y de producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otras funciones. Desde tiempo atrás se les ha clasificado como macrófagos M1 y macrófagos M2, según el tipo de citocinas a las que hayan estado expuestos y que han inducido en ellos una modulación de su fenotipo y por consiguiente, de sus capacidades funcionales. De modo similar a lo que ha ocurrido con los linfocitos CD4+, se ha sugerido que es útil clasificar a estas células con fenotipos diferentes, con base a una o a un grupo de funciones para las que el nuevo fenotipo adquirido sea más eficientes (Edwards 2008). La importancia de caracterizar las capacidades funcionales de macrófagos con fenotipos diferentes reside en el hecho de que de acuerdo al fenotipo que presenten, estas células pueden colaborar a la resolución o bien al agravamiento o cronicidad de una condición patológica. Así por ejemplo se ha demostrado que la activación de macrófagos es importante en el desarrollo de la diabetes tipo II (Fadini 2013), y también se ha hecho evidente que el balance de monocitos M1/M2 en circulación es importante para el riesgo cardiovascular (Mantovani 2009).

Con base a lo anterior, consideramos que en el estudio de las subpoblaciones de monocitos hay dos cuestiones importantes a considerar: 1) el tipo de modelo utilizado que represente lo ocurrido *in vivo*, y 2) la identificación de patrones de expresión de moléculas de membrana, que permitan explicar la función de estas células en homeostasia o condiciones patológicas, y que colaboren con su fenotipificación.

La obtención de macrófagos a partir de monocitos aislados de sangre periférica, resulta una de las alternativas más usadas en el estudio de macrófagos humanos. Sin embargo, una de las dificultades que representa esta metodología, es la variabilidad intrínseca entre las células de diferentes donadores, derivada tanto de factores genéticos como ambientales, que son difícilmente controlables pero que indudablemente determinan la respuesta de las células a las condiciones o estímulos experimentales, como en nuestro caso a las citocinas. Esto introduce una alta variabilidad en los resultados, dificultando la reproducibilidad y por tanto la posibilidad de demostrar diferencias con significancia estadística. Debido a las dificultades que representa utilizar este modelo, se consideró el uso de dos modelos alternativos a los cultivos primarios de monocitos humanos: el uso de macrófagos murinos o el uso de líneas celulares humanas.

En el modelo murino, la tendencia actual para la obtención de macrófagos es derivarlos *in vitro* a partir de células obtenidas de la médula ósea de los animales. Aunque este modelo supone una menor variabilidad al partir de animales de cepas singénicas y con condiciones ambientales controladas, para nosotros este modelo tiene la desventaja de que en nuestro laboratorio hemos venido trabajando en el modelo humano, y contamos con reactivos (anticuerpos, citocinas, etc) para células humanas. Sin embargo, el anterior argumento no fue el único por el cual se rechazó la posibilidad de utilizar un modelo murino. Se han realizado diversos análisis comparativos entre la respuesta inmune en ratón con relación a lo que ocurre en humano (Mestas 2004; Murphy 2013). Si bien los modelos murinos son una alternativa muy aproximada, siguen existiendo deficiencias en este modelo. Reportes recientes argumentan que el patrón de respuesta de células murinas *versus* el de células humanas frente a LPS, es considerablemente distinto (Seoka 2013). De forma específica, en nuestro campo de estudio como lo es la

polarización de los macrófagos, los marcadores establecidos para caracterizar los fenotipos de polarización en células murinas son distintos a los aceptados para células humanas. Un ejemplo de esto ha sido la expresión de Arginasa 1, la cual discutiremos más adelante, que ha mostrado ser un marcador muy variable en humano mientras que en el ratón es un marcador consistente de la polarización a macrófagos reparadores de tejido.

Con base en estas consideraciones, se decidió utilizar una línea celular de origen humano para el establecimiento de nuestro modelo experimental. Las líneas celulares han sido obtenidas principalmente a partir de células de neoplasias adaptadas al cultivo *in vitro*, o bien son células derivadas de cultivos primarios que han sido “inmortalizadas” por infección con virus, por la introducción de genes virales, o por tratamiento con agentes mutagénicos. Tomando en cuenta esto, el nivel de mutaciones en estas células es mayor al que existe en una célula normal (Adati 2009). El contar con una línea celular proveniente de cáncer, indica un cambio en la regulación de una o varias proteínas de ciclo celular, así como en algunos procesos celulares.

A pesar de las limitaciones que representa trabajar con líneas que no funcionan igual que una célula normal, las ventajas que ofrecen son diversas. En primer lugar, permite trabajar en un modelo de la misma especie de nuestro tema de estudio, en nuestro caso el humano. Así mismo, al igual que lo que puede llevarse a cabo con ratones transgénicos, las líneas celulares representan un modelo en el cual se pueden implementar modificaciones génicas como silenciamiento de genes, expresión de proteínas heterólogas, sobreexpresión o reducción en la expresión de proteínas endógenas, entre muchos más. Una ventaja más con respecto al empleo de un modelo murino, representa la inversión económica de la conservación de las células de trabajo. Comparado con el modelo de cultivos primarios de monocitos de sangre periférica de donadores humanos, ofrece una mayor reproducibilidad y una fuente constante de material experimental.

Después de considerar todas estas variables, se decidió establecer el modelo de polarización *in vitro* usando la línea celular THP-1. Estas células fueron obtenidas originalmente del cultivo primario de monocitos de un paciente con leucemia monocítica aguda (Tsuchiya 1980). Los

monocitos pueden emplearse como precursores *in vitro* de macrófagos, para el caso de cultivos primarios es la adherencia lo que activa el proceso de diferenciación, cuando son utilizados monocitos de línea celular, como es nuestro caso, es necesario encontrar un activador que induzca la diferenciación celular. Se entiende como *diferenciación celular* al proceso por el cual las células sufren modificaciones en su expresión génica, para adquirir la morfología y las funciones de un tipo celular específico. Varios protocolos han sido utilizados para diferenciar células THP-1 a unas células tipo macrófagos, entre ellos la activación con VD3 o PMA (Daigneault 2010). Nuestro primer reto fue encontrar un protocolo de diferenciación que nos permitiese obtener células tipo macrófago que conservaran su capacidad fagocítica y que respondiesen a las citocinas adquiriendo un fenotipo característico de estados polarizados. El descanso de 2 días de las células diferenciadas con PMA resultó ser muy importante, pues permitió que las células pudieran ser polarizadas con las citocinas correspondientes. El PMA es un activador de la PKC, y debido a que esta cinasa participa en diferentes cascadas de señalización, es de esperarse que este reactivo active en la célula cambios en la expresión génica, que se traduzcan en la diferenciación celular. Sin embargo, muchas vías de señalización en la célula pueden permanecer activadas en presencia del PMA, por lo cual es preciso retirar el PMA para restaurar un estado basal de activación en las células.

Aunado al cambio de morfología en las células diferenciadas, con relación a las células monocíticas (Figura 4), la evidencia de un proceso de diferenciación fue el aumento en la expresión de CD11b, subunidad alfa del receptor 3 para complemento (CR3), el cual se expresa en niveles muy bajos en los monocitos, y su expresión aumenta unas trescientas veces tras el tratamiento con PMA (Figura 5C). Ya se ha observado que los macrófagos diferenciados de monocitos de sangre periférica incrementan su tamaño y su granularidad, presentan una ligera disminución en la expresión de CD14 y un aumento en CD11b (Daigneault 2010); en nuestro sistema *in vitro*, los cambios morfológicos y la expresión de CD11b son características reproducibles, indicándonos tener una células similares a macrófagos de un individuo sano.

Se sugiere que los monocitos en circulación que tienen el fenotipo CD14⁺CD16⁺CD64⁻ (Taylor 2005) son la población que migra a tejidos y regenera la poza de macrófagos residentes, estos

macrófagos van a llevar a cabo un proceso de “priming” que les permitirá tener un fenotipo específico para el tejido en el cual residirán; por ejemplo, los macrófagos de la pulpa roja del bazo difieren en sus capacidades fagocíticas respecto a los macrófagos de la pulpa blanca, siendo los primeros más eficientes para fagocitar hierro libre. Estos cambios son el resultado de una diferenciación final del macrófago que está regulada por el tejido en el cual va a residir. En ausencia de estímulos que indiquen pérdida de la homeostasis tisular, inducidos sea por la presencia de un patógeno o por daño tisular, el macrófago se encuentra en un estadio cero (MØ0), que aún no es polarizado. El proceso de *polarización* del macrófago lo definimos como el cambio que se produce en la célula a partir de un estado “basal”, mediante el cual la célula adquiere características o rasgos distintivos que la hacen más eficiente para participar en distintos procesos. Esta polarización es inducida por citocinas liberadas por células de la inmunidad innata o de la adaptativa, en respuesta a estímulos diversos. Así por ejemplo, la polarización al fenotipo inflamatorio es inducida por citocinas como el IFN γ secretado por células NK (innata) o por células T cooperadoras con el fenotipo Th1. El término polarización se utiliza de forma diferente a lo nombrado como *activación*, donde hacemos referencia al momento en el cual la célula reconoce un estímulo microbiano y responde a él con una función efectora como fagocitosis, secreción de citocinas, estallido respiratorio, etc. Por lo tanto, una célula polarizada sería aquella que ha sufrido diferentes cambios fenotípicos y de funcionalidad (Gordon 2010).

Nuestro objetivo principal fue poder generar células polarizadas hacia los tres tipos “básicos” propuestos de subpoblaciones de macrófagos: macrófagos reparadores de tejido (MØrep), macrófagos reguladores (MØreg) y macrófagos inflamatorios (MØinf) (Figura 2) (Mosser 2008). Para poder determinar el estado de polarización de las células, se eligieron marcadores que fueran expresados exclusivamente en estas poblaciones. Existen reportes con una gran cantidad de información sobre la fenotipificación de estas subpoblaciones con base a diversos parámetros, como: marcadores de membrana específicos para cada subpoblación (Jaguin 2013), la presencia de ciertas especies de micro RNA interferentes (Graff 2012), caracterización de los perfiles transcripcionales (Martinez 2006) así como la expresión de factores de transcripción y la activación de vías de señalización (Biwas 2011; Akira. S. Satoh 2012). Dentro de los marcadores de membrana utilizados, seleccionamos tres: CD206, receptor de manosa

para MØreparadores; CD163, receptor scavenger especializado en el aclaramiento de hemoglobina, para MØreguladores (Akila 2012), y CD80, una molécula co-estimuladora para la identificación de MØinflamatorios.

Una de las ventajas que mostró nuestro modelo fue que monocitos y MØ0 (datos no mostrados y Figura 7, respectivamente) no expresan los receptores que utilizamos para identificar el estado de polarización, es decir, tenemos un estado originalmente no polarizado. En la diferenciación de macrófagos a partir de monocitos de sangre periférica, algunos protocolos proponen la utilización de factores de crecimiento como GM-CSF o M-CSF, para lograr diferenciaciones homogéneas, sin embargo, se ha demostrado que estas citocinas modifican el estado de polarización inicial en el que se encuentran los macrófagos, induciendo un perfil M1 con el uso de GM-CSF y M2 con M-CSF, (Jaguin 2013) lo cual llevaría a iniciar el estudio de la influencia de las citocinas polarizantes, en una célula previamente polarizada. Con base en la expresión de los marcadores elegidos, podemos decir que la polarización a MØreg y MØinf fue exitosa y específica. Por el contrario, en presencia de IL-4 no se observó que las células modificaran la expresión de CD206, lo cual si ocurre al tratar con IL-4 a macrófagos diferenciados de monocitos de sangre periférica (Anexo 5).

Se ha reportado en la literatura que las células THP-1 expresan el receptor para IL-4, y también que las células THP-1 tratadas con IL-4, responden a esta citocina regulando la expresión de DC-SIGN (Changzhong Jin 2012). Asimismo, Daigneault observó el aumento en la expresión de CD206 en membrana, tras la fagocitosis de *Pneumococo sp.* inactivado, por células THP-1 tratadas con PMA (Daigneault 2010). En este trabajo al igual que lo realizado por Graff, en el cual se identificaron los cambios de expresión de algunos miRNAs en el mismo modelo celular, no se logró identificar una sobreexpresión de CD206 (Graff 2012). Con base a estas evidencias, concluimos que en el caso de este protocolo de polarización, el monitoreo de CD206 no es adecuado para caracterizar a los macrófagos reparadores de tejido, y que es posible que se requiera de un estímulo más complejo para inducir el cambio de expresión de CD206, o el sinergismo con IL-10 para incrementar la expresión del receptor para IL-4 (Murray 2011).

Como una alternativa para caracterizar a los MØrep intentamos demostrar la expresión del RNAm para la Arginasa 1 (Arg1), la cual es una enzima que participa en la vía de producción de componentes de matriz extracelular, como colágena y fibronectina; esta enzima permite la producción de L-prolina a partir de la ruptura de la arginina (Munder 2009), y ha sido un importante marcador en la caracterización de macrófagos reparadores murinos (Ho 2009). Sin embargo, no se pudo detectar la expresión del RNA mensajero por PCR cuantitativa en ciclos confiables (datos no mostrados). El análisis del perfil transcripcional inducido tras la activación con IL-4/IL-13, indican que los macrófagos humanos muestran un perfil transcripcional muy complejo (a diferencia de sus contrapartes murinos), donde Arg1 no es modulada positivamente, pero sí lo son CD206 así como algunas lectinas tipo-C (Scotton 2005). Esta situación nos lleva a seguir buscando un marcador confiable para la caracterización de esta subpoblación. Recientemente se ha propuesto, tras comparar el perfil transcripcional y proteómico de macrófagos humanos *versus* macrófagos murinos, que la expresión de la transglutaminasa tipo 2 (TGM2) puede servir como un marcador confiable para macrófagos reparadores de tejido tanto en células de ratón como humanas (Matlung 2012; Martinez 2013).

Una vez establecidas las condiciones de diferenciación y polarización, iniciamos el estudio de la expresión de los distintos tipos de receptores para anticuerpos del isotipo IgG (FcγR) en las cinco poblaciones celulares: monocitos (THP-1), macrófagos cero, macrófagos reparadores de tejido, macrófagos reguladores y macrófagos inflamatorios. Los FcγRs participan en la eliminación de partículas opsonizadas con IgG y en la depuración de inmunocomplejos en sangre, a través de la fagocitosis de los mismos. Se determinó comparativamente la expresión de estos receptores en membrana, así como la expresión de los RNA mensajeros para estos receptores.

Tabla 3. Resumen de la expresión relativa de marcadores y FcγRs en diferentes estados de polarización.

		MØ cero	MØ reparadores de tejido	MØ reguladores	MØ inflamatorios
CITOCINA		-	IL-4	IL-10	INFγ
MARCADORES	CD206	+	+	+	+
	CD163	+	+	+++++	++
	CD80	+	+	++	++++
FcγR (membrana)	RI	+	+	++	+++++
	RII	+	+	++	+
	RIIa	+	+	+++	+
	RIII	-	-	-	-
	RIIb	+	++	+++	+
FcγR (RNAm)	RI	+	+	++	++
	RIIa	+	++	+++	++
	RIII	+	++	++++	+++
	RIIb	+	++	+++	+
FAGOCITOSIS		++	+	++++	+

En la tabla 3 se muestra un resumen de los cambios relativos en la expresión de los receptores Fcγ en cada estadio de polarización, así como la capacidad de fagocitosis a través de receptores Fcγ, en los macrófagos cero y polarizados con las distintas citocinas. Los MØreg son los que presentan, en un panorama global, cambios más drásticos en la expresión de los receptores, seguidos por los MØ inflamatorios. A pesar de que no logramos observar cambios en la expresión de CD206 o de RNAm para Arginasa 1 tras el estímulo con IL-4 durante 48 horas, las MØrep son fenotípica y funcionalmente diferentes a los MØ0. Con base a esto, podemos concluir que cada estadio de polarización tiene un perfil de expresión de FcγRs específico.

La presencia de IL-4 en un proceso inmunológico promueve un ambiente antiinflamatorio, y se ha asociado con infecciones por helmintos parásitos y con enfermedades como asma y alergia (Mohrs 2005). Esta citocina induce cambios en los macrófagos que los llevan a la polarización hacia el fenotipo de macrófagos reparadores de tejido, nombre que está asociado a su alta capacidad de producción de componentes de matriz extracelular. En pacientes con trombocitopenia primaria, se asoció el incremento de IL-4 en plasma, con la disminución del FcγRI en monocitos de sangre periférica, sin evidencia de cambios en la expresión de otros FcγRs (Xin-guang 2011). Por otra parte, en pacientes con rinitis crónica con pólipos nasales, los macrófagos residentes en nariz fueron tipificados como M2, los cuales mostraron deficiencias para fagocitar *Staphylococcus aureus* (Krysko 2011). Al igual que estos estudios *in vivo*, en nuestro modelo *in vitro*, la expresión de FcγRI en membrana disminuye, sin cambios significativos en el RNAm, además de que las células son menos eficientes para fagocitar (Liu 2005). Por otra parte, el FcγRIIb (el único receptor Fcγ inhibitorio) muestra un aumento en su expresión a nivel de proteína y de RNAm. Por lo tanto, en cuanto a la expresión de estos receptores, estas células representarían un perfil inhibitorio; el aumento de FcγRIIb en conjunto con la disminución del FcγRI explicaría la incapacidad de las células para poder fagocitar eficientemente.

Con el transcurso de los años, se ha concluido que IL-10 no es sólo una citocina que promueva un perfil inhibitorio en la respuesta inmune, sino que es actualmente considerada como una citocina dual (Wilke 2011). La IL-10 tiene un efecto activador sobre los linfocitos CD8+, actuando sobre ellos como un factor de crecimiento y diferenciación, contrario a lo que ocurre con linfocitos CD4+ (Zlotnik 1991). Los macrófagos reguladores, de los tres estados de polarización estudiados, son los que presentan cambios más radicales en los perfiles de expresión de los FcγRs: modulan a la alza los tres receptores activadores, particularmente la expresión de FcγRIIa, tanto a nivel de proteína como de RNAm. Sin embargo, sumado a lo anterior, el incremento del receptor inhibitorio (FcγRIIb) nos lleva a clasificar este estado como una polarización mixta o intermedia. *In vivo* sólo un porcentaje muy pequeño de monocitos es CD16+, pero en macrófagos residentes, aquellos con perfiles M2 incrementan la expresión de

este receptor. Con relación a la fenotipificación de las subpoblaciones, CD16 podría representar un marcador para macrófagos reguladores, junto a CD163.

La capacidad fagocítica de los MØreg se ve incrementada en un 50% comparada con los MØ0, como se ha reportado en macrófagos diferenciados a partir de monocitos humanos (Frausto-Del-Río 2012), lo cual correlaciona con el aumento en la expresión de los subtipos activadores de los receptores Fcγ. A diferencia de los otros estados de polarización, en estas células hay una mayor expresión de FcγRIIa; esta isoforma tiene afinidad preferentemente por inmunocomplejos, y participa activamente en la fagocitosis de partículas opsonizadas. A pesar de que estos macrófagos también muestran un aumento en la expresión de FcγRIIb, la cooperación entre los subtipos activadores permite observar un incremento en la fagocitosis. Como se discutirá más adelante, es importante el balance entre las señales activadoras e inhibitorias para el funcionamiento de la célula.

Los macrófagos que se encuentran circundantes a tumores (TAM: tumor associated macrophages), son fenotípica y funcionalmente similares a los MØreg; la presencia de estos macrófagos disminuye la eficiencia de las inmunoterapias contra el cáncer, debido a que estos macrófagos generan un microambiente inmunosupresor, que colabora con el crecimiento del tumor y la metástasis (Stout 2009). Se ha sugerido que factores secretados por células tumorales también tienen la capacidad de polarizar a este tipo de subpoblación (Caras 2011). Estas células aumentan la expresión de receptores scavenger, y por consiguiente la fagocitosis de células senescentes. Tomando en consideración esto, puede ser que no sólo la expresión de los subtipos activadores sea la responsable del aumento en la capacidad fagocítica de los MØreg.

Los macrófagos inflamatorios, también llamados macrófagos activados por vía clásica, participan en la defensa del hospedero frente a infecciones principalmente de tipo bacterianas, por ello dentro de sus funciones importantes está su capacidad microbicida, dependiente de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, así como la secreción de citocinas (Forman 2001; Krausgruber 2011). Existen dos estrategias para polarizar a esta subpoblación, la primera

consiste en la activación por ligandos de TLRs e INF γ , la segunda sólo con la utilización de INF γ . La estimulación de macrófagos con INF γ y TNF antes de la infección con *Leishmania* spp. lleva a los macrófagos a ser más eficientes en la eliminación del parásito, en comparación a hacerlo solo con INF γ (O'Shea 2008); esto debido a que la activación de las células exclusivamente con INF γ produce un aumento en la polimerización de actina basal, lo cual impide una buena fagocitosis (Frausto-Del-Río 2012). En nuestro modelo *in vitro*, se reproduce lo observado en macrófagos derivados de monocitos, las células tratadas con INF γ disminuyen su capacidad fagocítica en un 40% con relación a los M ϕ 0, y tienen una mayor cantidad de actina polimerizada (Martagón Calderón 2013).

Con relación al perfil de expresión de los receptores Fc γ , los M ϕ inf aumentan significativamente la expresión del Fc γ RI, a nivel de membrana y de RNAm; también presentan un incremento en la expresión del RNA mensajero para Fc γ RIII. En contraste, la expresión del mensajero de Fc γ RIIb disminuye, lo cual nos lleva a pensar en un perfil claramente activador. Sin embargo, la capacidad de estas células para fagocitar partículas opsonizadas se ve disminuida, como se mencionó con anterioridad, debido a un cambio en la polimerización de actina basal. Se ha propuesto que un aumento en la polimerización de actina que tiene como consecuencia una menor movilidad de la célula, lo cual podría ayudar a la permanencia de la célula en el sitio de infección (Frausto-Del-Río 2012).

En el caso del análisis realizado para los M ϕ rep y los M ϕ reg, la expresión de los receptores Fc γ correlaciona con la capacidad fagocítica de las células; los M ϕ rep aumentan sólo la expresión de Fc γ RIIB y disminuyen la capacidad fagocítica; por el otro lado, los M ϕ reg todos los receptores activadores y su capacidad fagocítica. Esta correlación no se observa con los M ϕ inf donde probablemente cambios en la expresión de otras proteínas afecten también la capacidad fagocítica de la célula, aun cuando ésta parezca estar equipada para fagocitar a través de los receptores Fc γ eficientemente. Esto indica que la capacidad de una célula para fagocitar a través de un receptor no dependerá exclusivamente de la expresión en membrana de este receptor, sino que dependerá también de otros factores que participen en un proceso tan complejo como es la fagocitosis (Biwas 2011).

El caso particular del receptor FcγRIIb, que es la única isoforma inhibitoria de receptores Fcγ, es expresado en una gran variedad de células. En la mayoría de los casos es co-expresado con alguna o algunas isoformas activadoras de los FcγRs. El FcγRIIB parece controlar el umbral de activación en células de la inmunidad innata. Por otra parte, en linfocitos B este receptor regula la señal de activación proveniente del BCR. Ratones deficientes en FcγRIIB producen importantes cantidades de auto-anticuerpos, ocasionándoles una enfermedad tipo Lupus Eritematoso Sistémico. Por su capacidad de regular negativamente tanto la producción de anticuerpos como funciones efectoras de anticuerpos mediadas por receptores FcγR, se ha propuesto que este receptor constituye un punto de revisión (checkpoint) de la respuesta inmune humoral (Nimmerjahn 2011).

Existen varios reportes donde el aumento en la expresión del FcγRIIb se relaciona con la cronicidad de algunas infecciones (Dugast 2011). De modo similar a lo que ocurre en macrófagos, en neutrófilos se ha reportado que un aumento en la expresión del FcγRIIb sobre el FcγRIIa, de forma constitutiva en un individuo, lleva a tener células con capacidades fagocíticas disminuidas (van Mirre 2006). La presencia del ITIM en la isoforma inhibitoria del FcγRIIb, disminuye la entrada mediada por anticuerpos del virus del Dengue a las células, lo cual puede relacionarse con una buena o mala resolución de la infección (Boonnak 2013). Estas evidencias nos llevan a reconocer que, a pesar de que el perfil de expresión de estos receptores no es el único parámetro que determina la capacidad fagocítica de una célula, en otras instancias si se observa una relación directa entre la expresión relativa de formas activadoras/inhibidoras de estos receptores con las funciones efectoras que lleva a cabo la célula.

La regulación epigenética en muchos sistemas de expresión, ha permitido explicar cambios sutiles en los sistemas de señalización de una célula, cambios que no habían sido explicados con claridad evaluando cambios en factores de transcripción. En la actualidad, fenómenos como la polarización y la plasticidad de las células del sistema inmune también han sido relacionados con procesos de acetilación y metilación de histonas. De forma particular en macrófagos

polarizados, se ha observado que la presencia de algunas citocinas activa acetilasas de histonas que explican el cambio en la expresión de algunos genes, característicos de ciertos estadios de polarización. Por ejemplo, la acetilasa JMJD3 participa en la apertura de promotores de genes que codifican para proteínas expresadas en macrófagos reparadores de tejido (Akira 2012; Ivashkiv 2013).

PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas se encontraría interesante estudiar la regulación epigenética de los genes que codifican los FcγRs en cada estadio de polarización, así como las modificaciones postraduccionales que puedan sufrir estos y que afecten su funcionalidad ya sea para interaccionar con las IgGs o con su capacidad de transducción de señales. De esta forma podríamos explicar porque a pesar de que hay un aumento muy sustancial en el mensajero del FcγRIII no se observa su expresión en membrana, lo cual también implicaría estudiar mecanismos de regulación en la expresión de los FcγRs.

Hacer tinciones intracelulares del receptor FcγRIII para analizar si correlaciona con la cantidad de mensajero presente, pero no es capaz de ser expresado en membrana.

Al demostrar que cada uno de los estadios de polarización tiene un perfil específico de expresión de FcγRs, sumado a la expresión de los marcadores de polarización utilizados, este modelo podría ser utilizado para estudiar que ocurre con la modulación en la expresión de una amplia batería de receptores en células polarizadas.

CONCLUSIONES

El modelo *in vitro* de células THP-1 diferenciadas con PMA, y polarizadas a MØ inflamatorios y MØ reguladores, puede ser monitoreado con los marcadores CD80 y CD163 respectivamente. Representa, además un modelo útil que tiene varios puntos de intersección con modelos como el de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, y con lo observado *in vivo* en ciertas patologías.

La polarización a MØ reparadores de tejido no pudo ser monitoreada por la expresión de CD206 o Arg1; sin embargo, DC-SIGN o TGM2 pueden ser una alternativa de marcador, que debe determinarse en este modelo.

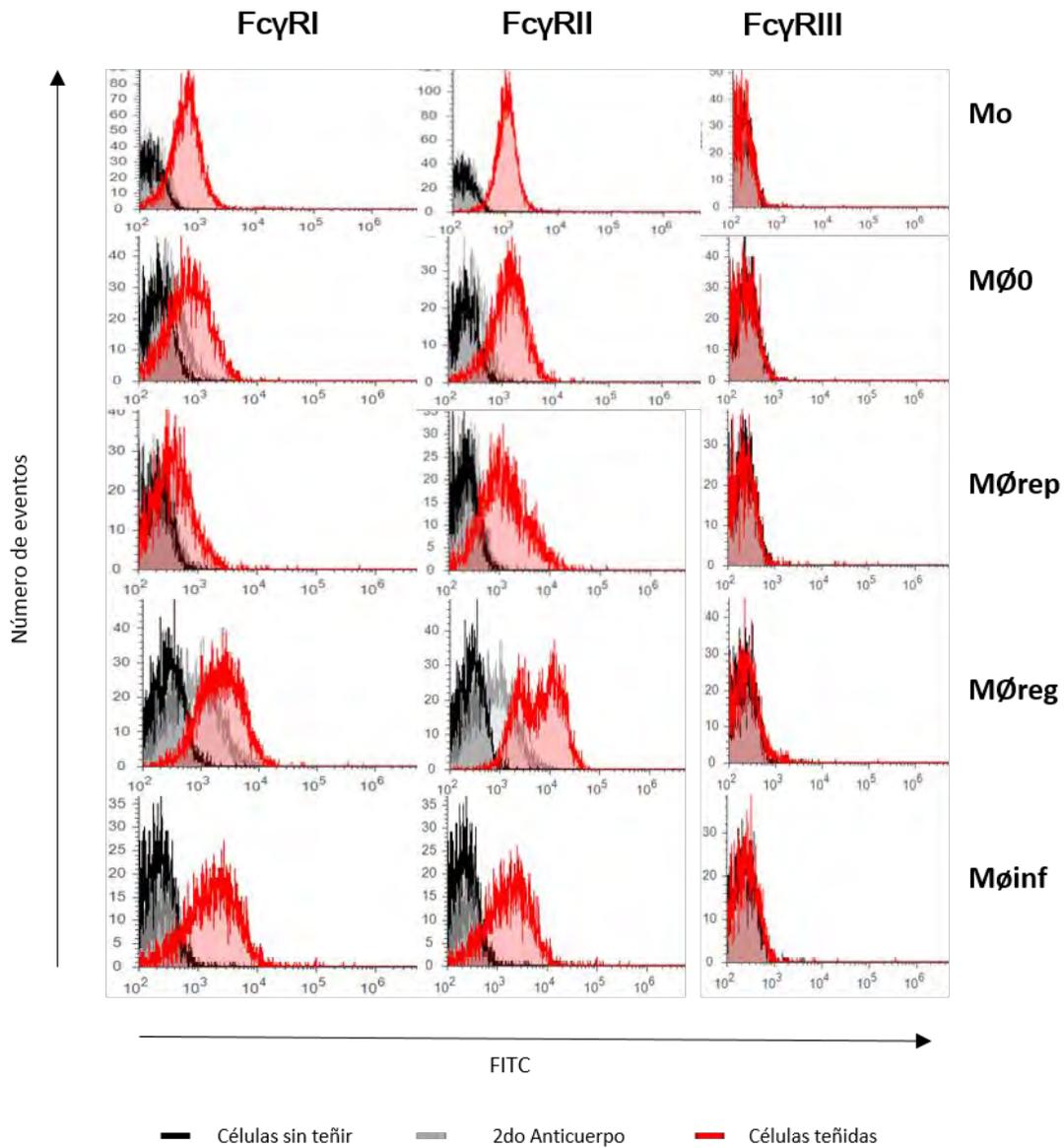
Cada estadio de polarización presenta un perfil característico y excluyente de expresión de receptores para Fcγ, el cual puede ayudar con el sistema de fenotipificación de macrófagos polarizados *in vivo*.

Para MØrep y MØreg la expresión de FcγRs correlaciona con una capacidad fagocítica disminuida y aumentada, respectivamente. En contraste, los MØinf presentan un perfil activador según la expresión de FcγRs, lo cual no se refleja en su capacidad fagocítica.

En este modelo, la expresión del RNA mensajero FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIb correlaciona con lo observado en membrana; las citocinas inducen cambios en el RNA mensajero de FcγRIII que no fueron evidenciadas con la expresión de la proteína en membrana.

ANEXOS

ANEXO 1. Expresión de FcγRI, FcγRII y FcγRIII en macrófagos con diferentes estados de polarización. Después de la polarización se determinó la expresión en membrana de FcγRI y FcγRII con una tinción indirecta; utilizando como anticuerpos primarios la clona 32.2 para FcγRI y la clona IV.3 para FcγRII; como anticuerpo secundario Anti-ratón FITC (Zymed 81-6511); FcγRIII es una tinción directa con anti-CD16 FITC, determinados por citometría de flujo.

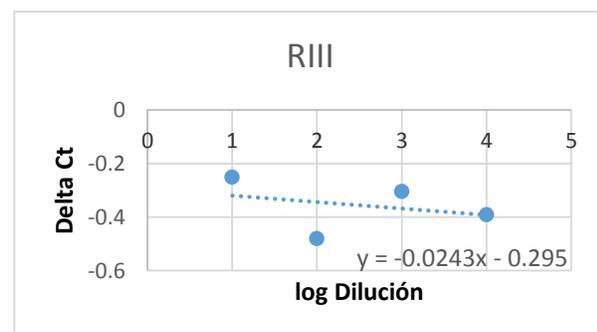
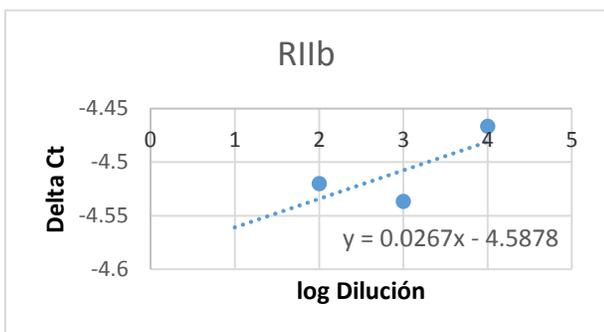
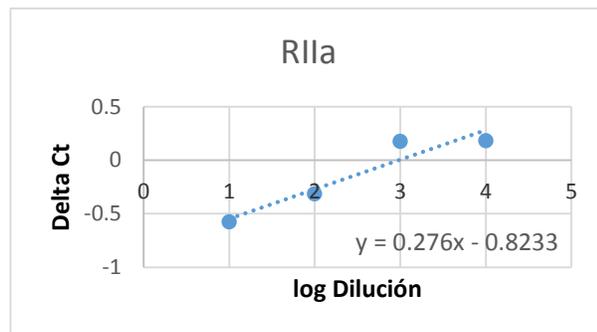
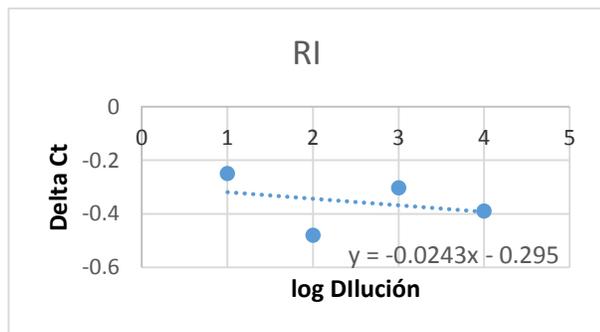


ANEXO 2. Calculo de la eficiencia de reacción de cada par de oligonucleótidos.

	m	(+/-)	Eficiencia
FcgRI	-3.399	2.983	96.9
FcgRIIa	-3.089	4.981	110.0
FcgRIIb	-3.162	2.295	107.1
FcgRIII	-3.374	6.980	97.9
Arg1	-----	-----	-----
HPRT	-3.365	3.567	98.2

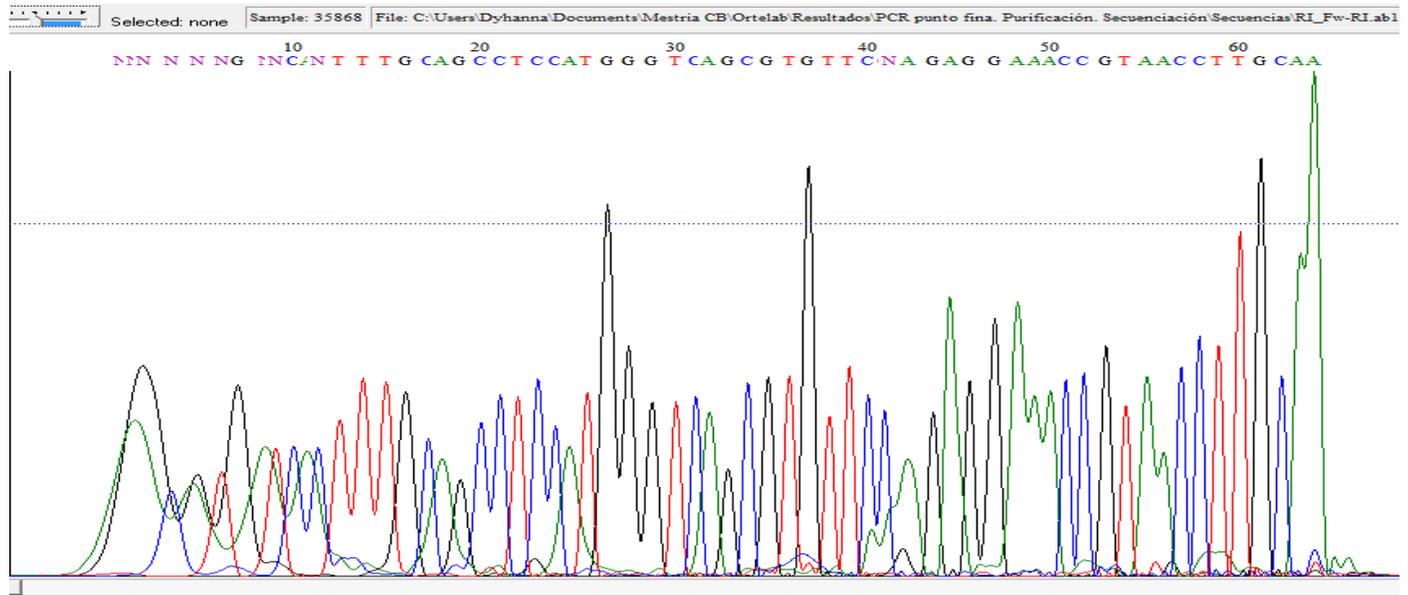
ANEXO 3. Validación de rangos dinámicos

Gráficos para la determinación de la validación de los rangos dinámicos $\Delta Ct = Ct \text{ problema} - Ct \text{ endógeno}$ vs el Log de la Dilución.

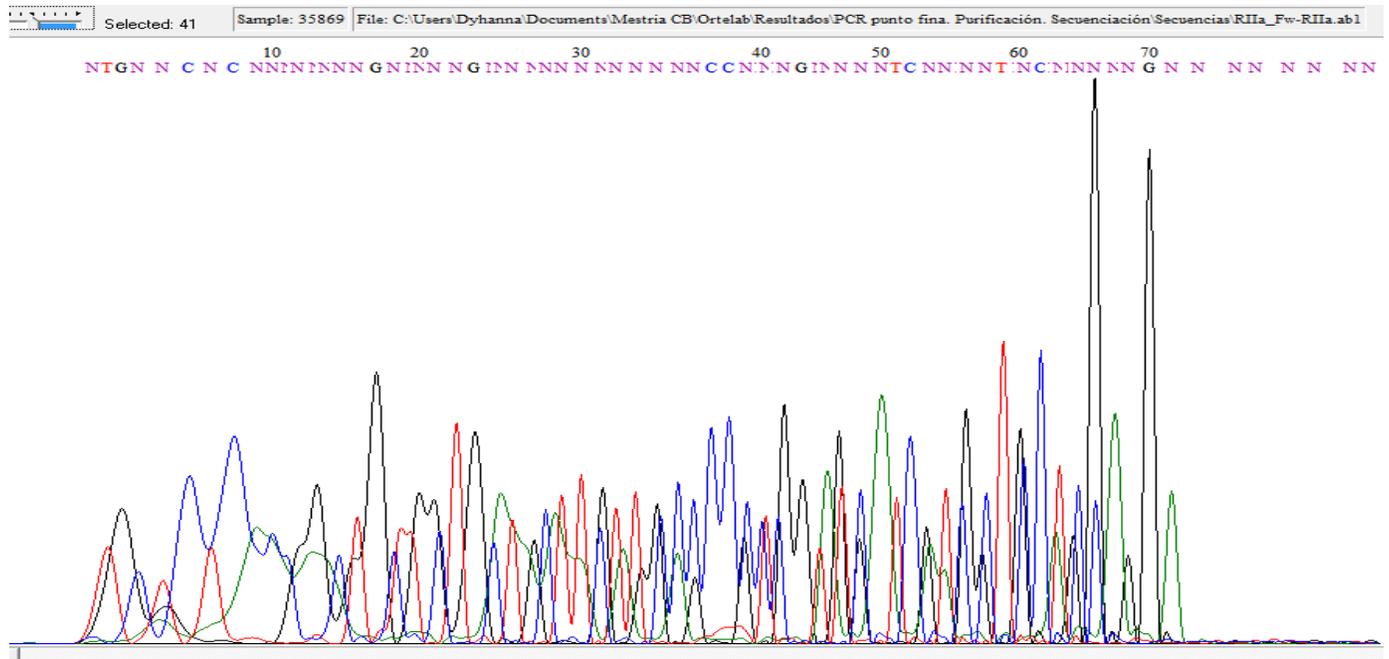


ANEXO 4. Ferogramas obtenidos tras la secuenciación de los productos de PCR punto final con los oligonucleotidos utilizados para PCR tiempo real.

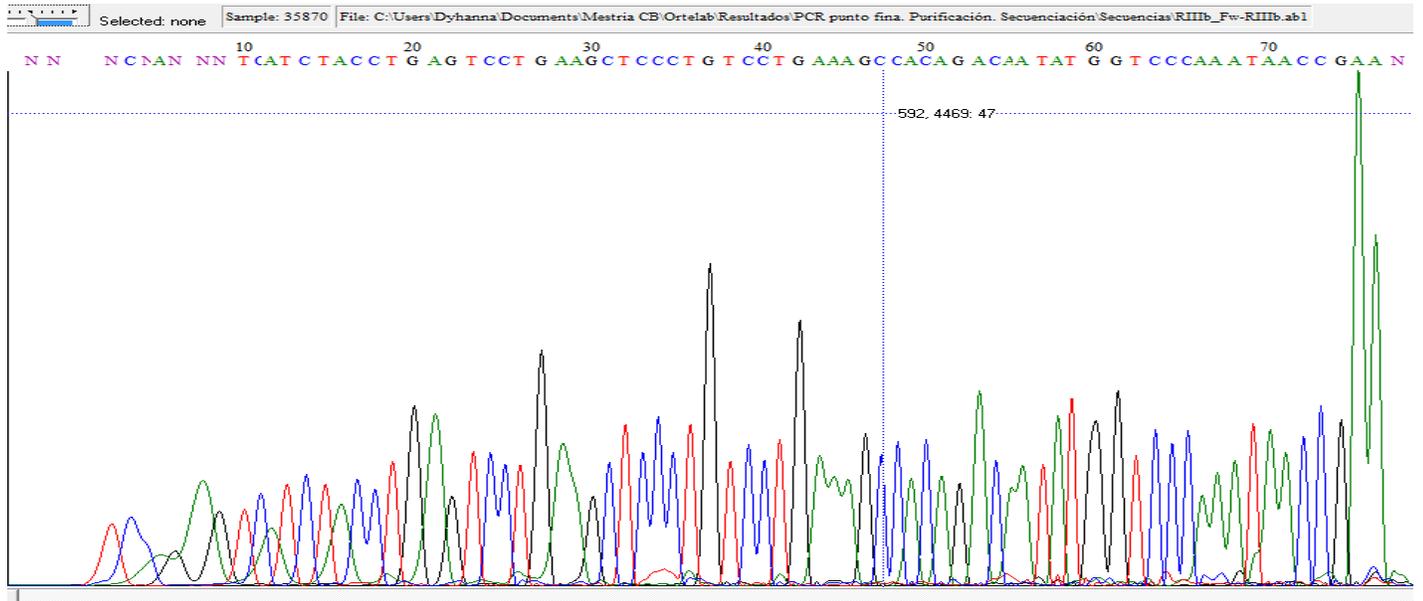
Ferograma 1: Producto para FcγRI, tamaño aproximado 83pb.



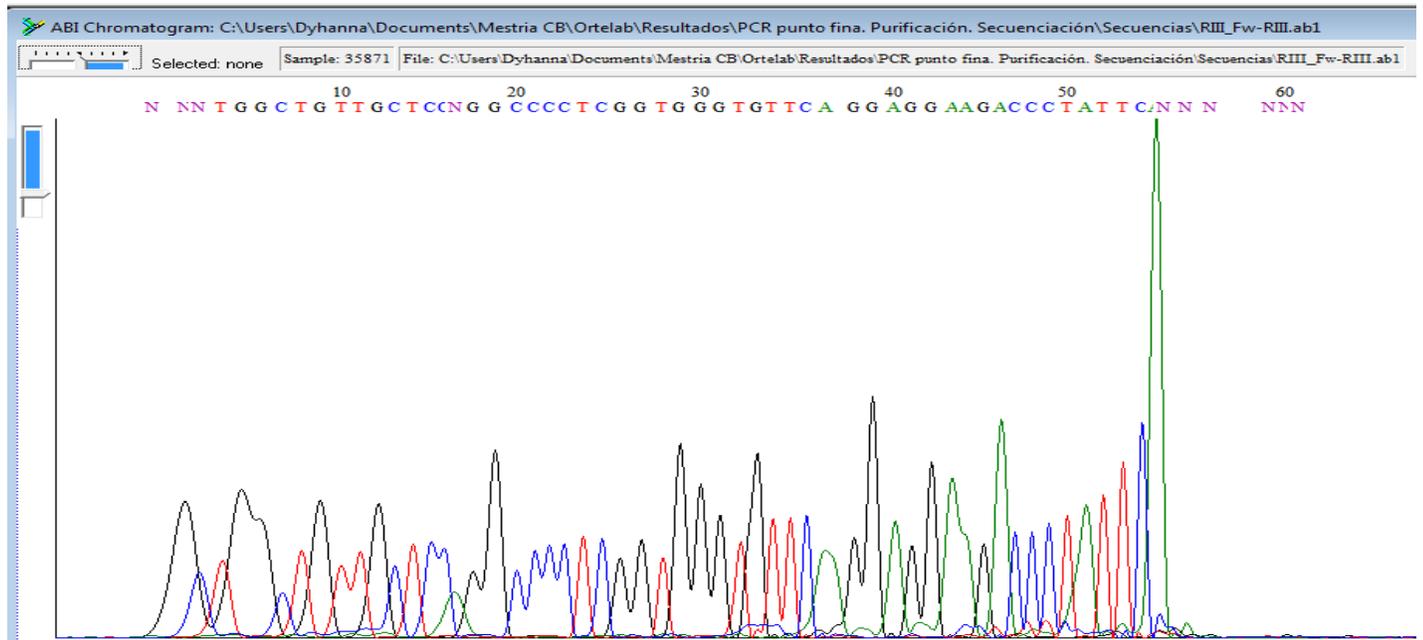
Ferograma 2: Producto para FcγRIIa, tamaño aproximado 80pb



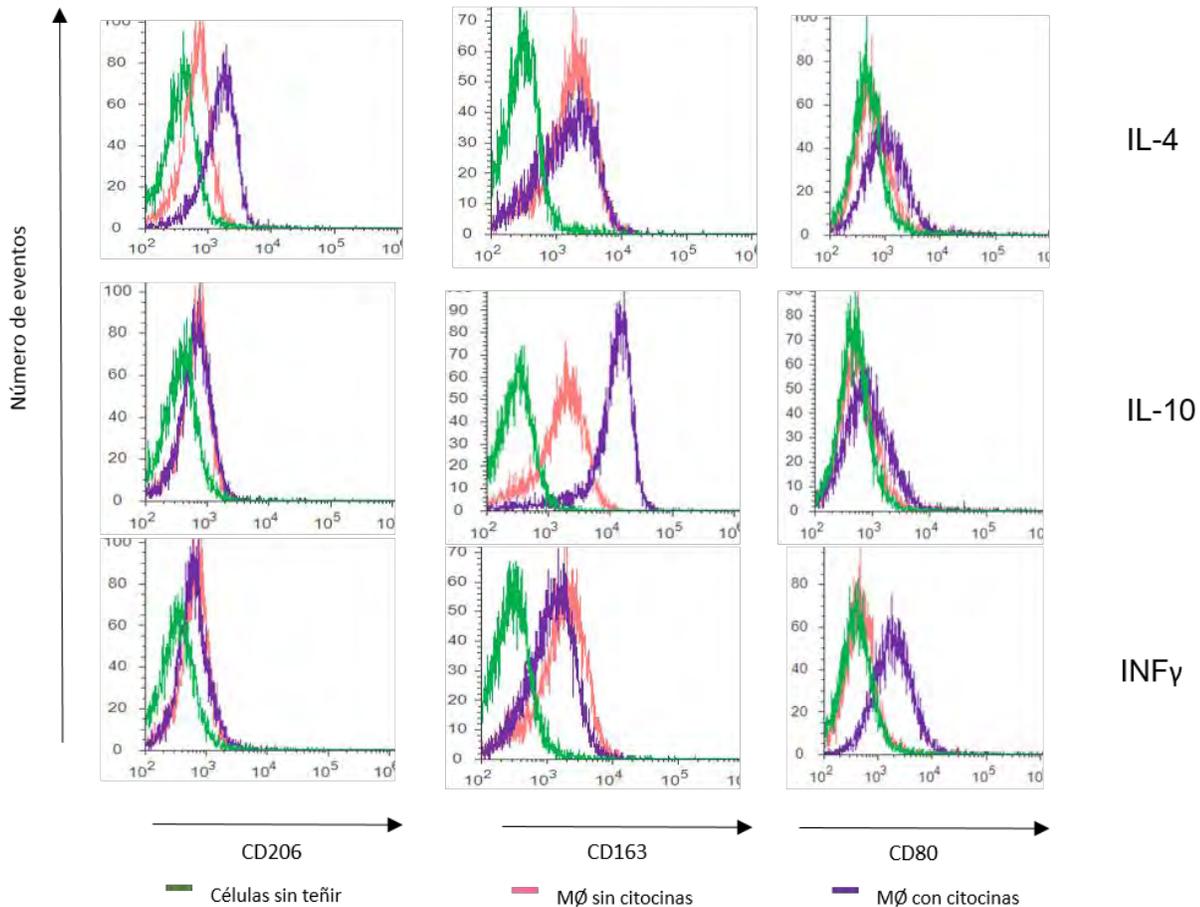
Ferograma 3: Producto para FcγRIIb, tamaño aproximado 97pb.



Ferograma 4: Producto para FcγRIII, tamaño aproximado 97pb.



Anexo 5. Macrófagos derivados de monocitos humanos modulan la expresión de los marcadores de polarización. Monocitos de donadores sanos fueron aislados por gradiente de concentración Ficoll Hypaque y separados de linfocito por adherencia. Después de 7 días de cultivo con medio RPMI suplementado y con 10% de SFB, las células fueron cultivadas con por 48h con 40ng/mL de IL-4 (MØrep); 20ng/mL de IL10 (MØreg); y 30ng/mL de INFγ (MØinf); o sin citocinas. Se tiñeron con una inmunofluorescencia directa con CD206-FITC, CD163-PE y CD80-APC.



Anexo 6. Obtención de suero policlonal anti eritrocitos de carnero.

El suero policlonal anti eritrocitos de carnero se obtuvo al llevar a cabo el esquema de inmunización utilizado en el Laboratorio de Inmunología General de la Facultad de Química, siguiendo el siguiente orden de administración.

DÍA	INÓCULO	VÍA DE ADMINISTRACIÓN
1	1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso	endovenoso
2	1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso	endovenoso

- 3 1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso endovenoso
- 4 1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso endovenoso
- 6 1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso endovenoso
- 8 1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso endovenoso
- 10 1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso endovenoso
- 13 1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso endovenoso
- 15 1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso endovenoso
- 17 1.0 mL de eritrocitos al 10% por Kg de peso endovenoso
- 20 SANGRIA DE COSECHA

BIBLIOGRAFIA

- Adati, N. H., M.C. Suzuki, T. Suzuki, H. Kojima, T. (2009). "High-resolution analysis of aberrant regions in autosomal chromosomes in human leukemia THP-1 cell line." BMC Research Notes **2**(153): 1-7.
- Akila, P. P., V. Suma, M.N. Prashant, S.M. Chaitra, T.R. (2012). "CD163 and its expanding functional repertoire." Clinica Chimica Acta **413**: 669-573.
- Akira, S. S., T. Takeuchi, O. Vandenbon, A. Yasuda, K. Tanaka, Y. Kumagai, Y. Miyake, T. Matsushita, K. Okazaki, T. Saitoh, T. Honma, K. Matsuyama, T. Yui, K. Tsujimura, T. M Standley, D. Nakanishi, K. Nakai. K (2012). "The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection." Nature Immunology **11**(10): 931-945.
- Akira. S. Satoh, T. T., O. Vandenbon, A. Yasuda, K. Tanaka, Y. Kumagai, Y. Miyake, T. Matsushita, K. Okazaki, T. Saitoh, T. Honma, K. Matsuyama, T. Yui, K. Tsujimura, T. M Standley, D. Nakanishi, K. Nakai. K (2012). "The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection." Nature Immunology **11**(10): 931-945.
- Ambarus, C. K., S. M. van Eijk, Hamann, J. Radstake, T. Reedquist, K. Tak, P. Baeten, D. (2011). "Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages." The Journal of Immunology Methods In Press.
- Asahi, A. N., T. Okazaki, Y. Suzuki, H. Masaoka, T. Kawakami, Y. Ikeda Y. Kuwana, M. (2008). "Helicobacter pylori eradication shifts monocyte Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura patients." The Journal of Clinical Investigation **118**(8): 2939-2949.
- Audrey Varin, S. (2009). "Alternative activation of macrophages: Immunefunctionand cellular biology." Immunobiology **214**: 630–641.
- Båve, U. M., M. Eloranta, M. Perers, A. Alm, G.V. Rönnblom, L. (2003). "Fc RIIa Is Expressed on Natural IFN-γ Producing Cells (Plasmacytoid Dendritic Cells) and Is Required for the IFN-γ Production Induced by Apoptotic Cells Combined with Lupus IgG1." The Journal of Immunology **171**: 3296-3302.
- Beutler, B. (2004). "Innate immunity: an overview." Molecular Immunology **40**: 845-859.
- Biwas, S. M., A. (2011). "Orchestration of metabolism by macrophages." Cell Metabolism **15**: 432-437.
- Boonnak, K. S., B.M. Donofrio, G.C. Marovich, M. A. (2013). "Human FcγRII cytoplasmic domains differentially influence antibody-mediated dengue virus infection." The Journal of Immunology **190**: 5659-5665.

Boross, P. v. d. P., K. Van de Winkel, J. Leusen, J. (2008). "Fc receptors." Encyclopedia of Life Sciences.

Browna, B. R., B. Goodman, S. Amar, S. Badylak, S. (2012). "Macrophage polarization: An opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine." Biomaterials **33**: 3792-3802.

Caras, I. T. C. L., L. Pitica, R. Melinceanu, L. NEagu, S. Salageanu, A. (2011). "Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: in vitro models of macrophages-tumor environment interaction." Tumori(97): 647-654.

Changzhong Jin, L., Jie Li, Meixin Fang, Linfang Cheng, and NanpingWu (2012). "Multiple Signaling Pathways Are Involved in the Interleukine-4 Regulated Expression of DC-SIGN in THP-1 Cell Line." Journal of Biomedicine and Biotechnology.

Daëron, M. (1997). "Fc receptor biology." Annual Review of Immunology **15**: 203-234.

Daigneault, M. P., J.A. Marriott, H.M. Whyte, M. Dockrell, D. (2010). "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages." PlosOne **5**(1): 1-10.

Dugast, A. T., A. Berger, C.T. Ackerman, M.E. Sciaranghella, G. Liu, Q. Sips, M.Toth, I. Piechocka-Trocha, A. Ghebremichael, M. Alter, G. (2011). "Decreased Fc receptor expression on innate immune cells is associated with impaired antibody-mediated cellular phagocytic activity in chronically HIV-1 infected individuals." Virology **415**: 160-167.

Edwards, D. M. M. a. J. P. (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nature Review Immunology **8**: 959-969.

Edwards, J. P. X. Z., Kenneth A. Frauwirth, and David M. Mosser (2006). "Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations." Journal of Luekocyte Biology **80**(6): 1298-1307.

Edwards, P. J. M., D. (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nature Review Immunology **8**: 959-969.

Elenkov, I. J. (2004). "Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance." Annas for The New York Academy of Sciences **1024**: 138-146.

Fadini, G. P. V. d. K., S. Boscaro, E. Albiero, M. Cappellari, R. Kränkel, N. Landmesser, U. Toniolo, A. Bolego, C. Cignarella, A. Seeger, F. Dimmeler, F. Zeiher, A. Agostini, C. Avogaro, A. (2013). "An unbalanced monocyte

polarisation in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy." Diabetologia **56**: 1856-1866.

Fairweather, D. C. D. (2009). "Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity." Journal of Autoimmunity **33**: 222-230.

Forman, H. J. a. T., M. (2001). "Signaling by the respiratory burst in macrophages." The Journal of International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Life **51**: 365-371.

Frausto-Del-Río, D., Isabel Soto-Cruz, Claudia Garay-Canales, Xochitl Ambriza, Gloria Soldevila, Jorge Carretero-Ortega, José Vázquez-Prado, Enrique Ortega (2012). "Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells." Cytokine **57**(1): 158–168.

Gerber, J. S. M., D. M. (2001). "Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fcγ receptors." Journal of Immunology **166**: 6861–6868.

Gordon, S. M., F.O. (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." Immunity **32**: 593-604.

Graff, J. D., A.M. Clay, G. McCaffrey, A.P. Wilson, M.E. (2012). "Identifying functional MicroRNAs in macrophages with polarized phenotypes." The Journal of Biological Chemistry **237**(26): 21816-21825.

Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., Kothe, K., Muller-Molinet, I., Kannookadan, S., Utikal, J., et al., (2006). "Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals." Immunobiology **211**: 473–486.

Hashimoto, D. C., A. Noizat, C. Teo, P. Beasley, M. Leboeuf, M. Becker, C. See, P. Price, J. Lucas, D. Greter, M. Mortha, A. Boyer, S. Forsberg, C. Tanaka, M. van Rooijen, N. Garcí'a-Sastre, A. Stanley, R. Ginhoux, F. Frenette, P. Merad, M. (2013). "Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes." Immunity **38**: 792–804.

Ho, V. W. H. S., L. (2009). "Derivation and Characterization of murine alternatively activated (M2) macrophages." Methods in Molecular Biology. Springer Science **531**: 173-185.

Indik, Z. P., J-G. Hunter, S. Scheriber, A. (1995). "The molecular dissection of Fcγ receptor mediated phagocytosis." Blood **85**: 4389-4399.

- Ivashkiv, L. B. (2013). "Epigenetic regulation of macrophage polarization and function." Trends in Immunology **34**(5): 216-223.
- Jaguin, M. H., M. Fardel, O. Lecureur, V. (2013). "Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin." Cellular Immunology **281**: 51-61.
- Karehed, K. D., A. Dahl, S. Nilsson, N. Öberg, F. (2007). "IFN- γ -induced upregulation of Fc γ -receptor-I during activation of monocytic cells requires the PKR and NF κ B pathways." Molecular Immunology **44**: 615–624.
- Kawachi, I. K., T. (2013). "T Lymphocytes: Helpers" eLS John Wiley and Sons, Ltd: 1-13.
- Kolls, J. K. L., A. (2004). "Interleukin-17 family members and inflammation." Immunity **21**: 467-476.
- Krausgruber, T. B., K. Smallie, T. Alzabin, S. Lockstone, H. Sahgal, N. Hussell, T. Feldmann, M. & A. Udalova, I. (2011). "IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses." Nature Immunology **12**(3): 231-238.
- Krysko, O. H., G. Zhang N. Kubica, M. Deswarte, K. Derycke, L. Claeys, S- Hammad, H. Brusselle, G. Vandenaabeele, P. Krysko, D. Bachert, C. (2011). "Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis." Experimental allergy and Immunology **66**: 396–403.
- Liu, Y. M., E. Blank, E. Kirou, K. Gao, X. Park, M. Pricop, L. (2005). "Cytokine-mediated regulation of activating and inhibitory Fc receptors in human monocytes." The Journal of Leukocytes Biology **77**: 767-776.
- Mantovani, A. G., C. Locati, M. (2009). "Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **29**: 1419-1423.
- Martagón Calderón, N. (2013). "Efecto del INF-gamma en dos modelos humanos de diferenciación monoctio-macrófago." Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas.
- Martinez, F. G., S. Locati, M. Mantovani, A. (2006). "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophages differentiation and polarization: New molecules and patterns of gene expression." The Journal of Immunology **177**: 7303-7311.
- Martinez, F. H., L and Gordon, S. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." Annual Review of Immunology **27**: 451-483.

Martinez, F. O. H., L. Milde, R. Varin, A. Melgert, B. Draijer, C. Thomas, B. Fabbri, M. Crawshaw, A. Pei Ho, L. Hackern, T. Cobos-Jimenez, V. Kootstra, N. Hamann, J. Greaves, D. Locati, M. Mantovani, A. Gordon, S. (2013). "Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences." Blood **121**(9): 57-68.

Matlung, H. N., A. Groen, H. van Gaalen, K. Tuna, B. G. van Weert, A. de Vos, J. Wentzel, J.J. Hoogenboezem, M. van Buul, J.D. Bakker, E. (2012). "Transglutaminase activity regulates atherosclerotic plaque composition at locations exposed to oscillatory shear stress." Artherosclerosis **224**: 355-362.

Mestas, J. H., C.C.W. (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." Journal of Immunology **172**: 2731-2738.

Mohrs, K., Wakil, A.E., Killeen, N., Locksley, R.M., and Mohrs, M. (2005). "A two-steps process for cytokine production revealed by IL-4 dual-reporter mice." Immunity **23**: 419-429.

Mosser, D. a. E., J.P. (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nature Review Immunology **8**: 959-969.

Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." Journal of Leukocyte Biology **73**: 209–212.

Munder, M. (2009). "Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system." British Journal of Pharmacology **158**: 638-651.

Murphy, W. (2013). "Of mice and human." Biology of Blood and Marrow Transplantation **In press**.

Murray, P. J. W., T.A. (2011). "Obstacles and opportunities for understanding macrophages polarization." Journal of Leukocytes Biology **89**: 557-563.

Nimmerjahn, F. L., J.D. (2011). "Expression and function of the inhibitory Fcγ-receptor in CIDP." Journal of the Peripheral Nervous System **16**: 41-44.

Nimmerjahn, F. R., J. (2010). "FcγRs in health and disease." Current Topic in Microbiology and Immunology **305**: 105-125.

O'Shea, J. J. M., P.J. (2008). "Cytokine signaling modules in inflammatory responses." Immunity **28**: 477-487.

Peracchia, M. G. B., Patrick Couvreur (2001). "Mononuclear Phagocytic System." Encyclopedia of Life Sciences.

Ploeger, D. v. P., S. Koerts, J. van Luyn, J. Hermsen, M. (2011). "Human macrophages primed with angiogenic factors show dynamic plasticity irrespective of extracellular matrix components." Immunobiology **In Press**.

Porcheray, F. V., S. Rimaniol, A. Leone, C. Samah, B. Dereuddre, N. Dormont, D. Gras, G. (2005). "Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation." Clinical and Experimental Immunology **142**: 481-489.

Salmon-Ehr V, R. L., Godeau G et al. (2000). "Implication of interleukina-4 in wound healing." Laboratory Investigation **80**: 1337-13343.

Scotton, C. F. O. M. M. J. S., M. Sironi, M. Locati, A. Mantovani, and S. Sozzani (2005). "Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocytes IL-1B system by IL-13." The Journal of Immunology **174**: 834-845.

Seoka, H. S., G. Cuencac, N. Mindrinosa, V. Bakerc, X. Richardsd, P. McDonald-Smithe, Hong Gaoa, Hennessyf, L. Finnertyg, C. López Shari Honarif, Ernest E. Mooreh, Joseph P. Mineii, Joseph Cuschierij, Paul E. Bankeyk, Jeffrey L. Johnsonh, Jason Sperryi, Avery B. Nathensm, Timothy R. Billiarl, Michael A. Westn, Marc G. Jeschkeo, Matthew B. Kleinj, Richard L. Gamellip, Nicole S. Gibranj, Bernard H. Brownsteinq, Carol Miller-Grazianok, Steve E. Calvanor, Philip H. Masone, J. Perren Cobbs, Laurence G. Rahmet, Stephen F. Lowryr,2, Ronald V. Maierj, Lyle L. Moldawerc, David N. Herndong, Ronald W. Davisa, Wenzhong Xiaoa, Ronald G. Tompkinst. (2013). "Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases." PNAS **110**(9): 3507-3512.

Stout, R. J., C. Matta, B. Tietzel, I. Watkins, S. Suttles, J. (2005). "Macrophages sequentially changes their functional phenotype in response to cahnges in microenvironmental influences." Journal of Immunology **175**: 342-349.

Stout, R. W., S. Suttles, J. (2009). "Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor associated macrophages." Jorunal of Leucocytes Biology **86**: 1105-1109.

Stuart, L. E., R. (2005). "Phagocytosis: elegant complexity." Immunity **22**: 539-550.

Taylor, S. G. a. P. R. (2005). "Monocytes and macrophage heterogeneity." Nature Review Immunology **5**(953-964).

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic

leukemia cell line (THP-1)." Journal of Cancer **26**: 171-176.

Tundup, S. S., L. Harn, Jr. D. (2012). "Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans." ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES **1253**(Glycomics of the Immune System): E1–E13.

Van Ginderachter, J. A. M., K. Hassanzadeh Ghassabeh, G. Meerschaut, S. Beschin, A. Raes, G. De Baetselier, P. (2006). "Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion." Immunobiology **211**: 487–501.

van Mirre, E. B., W.B. Geissler, J. Hack, E. de Boer, M. Roos, D. Kuijpers, T. W. (2006). "Neutrophil responsiveness to IgG, as determined by fixed ratios of mRNA levels for activating and inhibitory FcγRII (CD32), is stable over time and unaffected by cytokines." Blood **108**: 584-590.

Wilke, C. M. W., S. Wang, L. Kryczek, I. Kao, J. Zou, W. (2011). "Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon-gamma." Cancer Immunology Immunotherapy **60**: 1529-1541.

Xin-guang, L. M., S. Sun, J. Ren, J. Shi, Y. Sun, L. Dong, X. Qin, P. Guo, C. Hou, M. Peng, J. (2011). "High-dose dexamethasone shifts the balance of stimulatory and inhibitory Fc receptors on monocytes in patients with primary immune thrombocytopenia." Blood **117**(6): 2061-2069.

Zlotnik, C. W. (1991). "IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor." Journal of Immunology **147**: 528-534.