



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización del fenotipo de los macrófagos humanos
que realizan autofagia por activación con rapamicina**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MONSERRAT BUENDÍA ARELLANO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ESMERALDA JUÁREZ CARVAJAL
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

1. Datos del alumno

Buendía

Arellano

Montserrat

58 82 05 87

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de ciencias

Biología

307111722

2. Datos del Tutor

Dra.

Esmeralda

Juárez

Carvajal

3. Datos sinodal 1

Dra.

Martha

Torres

Rojas

4. Datos sinodal 2

Dra.

María Sandra

Cabrera

Benítez

5. Datos sinodal 3

Dra.

María Teresa

Herrera

Barrios

6. Datos sinodal 4

M en C.

Fernando

Hernández

Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización del fenotipo

de los macrófagos humanos

que realizan autofagia

por activación con rapamicina

59p

2015

La presente tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal en el Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER). La autora agradece la beca de titulación 2014 recibida de la Secretaría de Educación Pública (SEP).

"El dios en quien yo creo no manda los problemas, sino la fuerza para sobrellevarlos"

Harold S. Kushner

"El hombre se descubre cuando se mide con un obstáculo"

Antonie de Saint-Éxupery

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal por su confianza, apoyo, valiosas enseñanzas, el tiempo y la dedicación durante estos 3 años. Gracias por enseñarme, por ser un ejemplo de calidad humana y trabajo constante.

A la Dra. Martha Torres Rojas por sus opiniones y apoyo durante toda mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. María Sandra Cabrera Benítez por sus estimulantes opiniones y sugerencias sobre esta tesis, gracias por ayudarme en esta travesía.

A la Dra. María Teresa Herrera Barrios por sus aportaciones, apoyo incondicional y valiosas opiniones durante toda la realización del trabajo, muchas gracias.

Al M. en C. Fernando Hernández Sánchez, gracias por sus consejos, sugerencias y por sus contribuciones a mi formación.

A la Dra. Elsy Beatriz Canché Pool gracias por iniciarme en este largo camino, aún me falta camino por recorrer, gracias por tu paciencia, cariño, enseñanzas y brindarme tu amistad.

A mis compañeros del laboratorio Claudia, Samuel, Lupita, Maríchui y Janet gracias por las aportaciones, risas, el apoyo incondicional, nunca podría terminar de agradecerles. A mi compañera de trabajo, Andy gracias por ayudarme.

A mi osito, caballo, gorila y nutria gracias por acompañarme, aguantarme, quererme y brindarme su amistad, lo más valioso que puedo tener, muchas gracias chicas por no morir en el intento ni en las prácticas de campo.

A Bruno, Gabriel, Diego y Nano gracias por su amor y fe en mí.

Y gracias a todos los que están o estarían orgullosos de que haya llegado hasta aquí.

非常感谢大家

Dedicatoria

A mi madre un ejemplo de perseverancia, constancia, amor y trabajo, gracias por nunca rendirte. A mi padre por ser un ejemplo de trabajo y dedicación. A mi hermana por tu compañía, apoyo incondicional y ser un ejemplo a seguir.

Ustedes son el corazón que me mantiene en viva.

我的宝宝，我的最珍贵的玉，我爱你.r

Tabla de contenido

Lista de tablas.....	x
Lista de figuras	x
Tabla de abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Antecedentes	3
1. Introducción	4
2. Sistema inmune.....	5
2.1. Monocitos	6
2.2. Macrófagos.....	6
2.2.1. Polarización de los Macrófagos.....	6
3. Autofagia	13
Justificación	17
Hipótesis.....	18
Objetivo.....	18
Objetivos específicos.....	18
Metodología.....	19
Obtención de monocitos.....	19
Obtención y estimulación de macrófagos diferenciados en M1 y M2	20
Determinación de autofagia y del fenotipo de los macrófagos por citometría de flujo.....	20
Estrategias de análisis de datos	23
a) Selección de células individuales viables	23
b) Cuantificación de autofagia	24
c) Determinación del fenotipo	25
c) Cuantificación de TNF- α por ELISA.....	27
Resultados	28
Generación de macrófagos M1 y M2	28
Fenotipo de los macrófagos M1 y M2.....	33
Determinación de la inducción de la autofagia en los macrófagos M1 y M2.....	34
Determinación del fenotipo de los macrófagos estimulados con rapamicina.....	35

Discusión	39
Conclusiones	43

Lista de tablas

TABLA 1. LOS MACRÓFAGOS M1 Y M2 PRESENTAN PROPIEDADES ANTAGÓNICAS.....	9
TABLA 2. MARCADORES CELULARES PARA LOS CUALES UTILIZAMOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA EVALUAR LA DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS.	11
TABLA 3. CONFIGURACIÓN DEL PRIMER PANEL DE TINCIÓN.....	21
TABLA 4. CONFIGURACIÓN DEL SEGUNDO PANEL DE TINCIÓN.....	22

Lista de figuras

FIGURA 1. ESQUEMA DE DIFERENCIACIÓN DEL MONOCITO HACIA MACRÓFAGO.	7
FIGURA 2. VÍA DE ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA.	14
FIGURA 3. IMPORTANCIA DE LA VÍA DE LA AUTOFAGIA EN LA SUPERVIVENCIA DE LA CÉLULA.....	16
FIGURA 4. SELECCIÓN DE CÉLULAS INDIVIDUALES VIVAS.....	23
FIGURA 5. CAMBIO EN LA INTENSIDAD MEDIANA DE FLUORESCENCIA.....	25
FIGURA 7. SEGUNDA COMBINACIÓN DE MARCADORES. -.....	26
FIGURA 8. PRODUCCIÓN DE TNF α EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN CON LPS.	29
FIGURA 9. MORFOLOGÍA EN LOS MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS M1 Y M2.	30
FIGURA 10. EVALUACIÓN DEL %CD14 EN LOS MACRÓFAGOS M1 Y M2.).....	32
FIGURA 11. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO DE LOS MACRÓFAGOS. LOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS (MDM)	33
FIGURA 12. CAMBIO EN LA INTENSIDAD MEDIANA DE FLUORESCENCIA (AUTOFAGIA) RELATIVO A LOS MACRÓFAGOS SIN ESTIMULO.).....	35
FIGURA 13. DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LOS MACRÓFAGOS.	36
FIGURA 14. ANÁLISIS DE FENOTIPO DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS CON EL SEGUNDO PANEL DE MARCADORES.	37
FIGURA 15. CAMBIO EN LA INTENSIDAD MEDIANA DE FLUORESCENCIA (AUTOFAGIA) EN MACRÓFAGOS ESTIMULADOS DURANTE 48 HORAS.....	38
FIGURA 16. EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE CD14 EN MACRÓFAGOS ESTIMULADOS DURANTE 48 HORAS.....	39

Tabla de abreviaturas

AAMØ	Vía de activación alternativa de macrófagos
ATG	Del inglés Autophay related
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
CAMØ	Vía de activación clásica de macrófagos
CARD	Dominios de reclutamiento de caspasas
CCL	Ligandos de quimiocina
CD	Del inglés cluster differentiation
CXCL	Ligandos de quimiciona (con motivo C-X-C)
DC	Célula dendrítica
DC-SIGN	Específico de las células dendríticas moléculas de adhesión intercelular-3grabbing no integrina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófagos
IL	Interleucina
IMF	Intensidad mediana de fluorescencia
<i>in vitro</i>	De latín dentro del vidrio
<i>in vivo</i>	De latín dentro de la vida
LPS	Lipopolisacárido
M1	Macrófago 1
M2	Macrófago 2
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDP	Muramildipéptido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Mesh	Del inglés Medical subject headings

mTOR	Receptor de rapamicina en mamíferos
mTORC1	Receptor de rapamicina en mamíferos complejo 1
mTORC2	Receptor de rapamicina en mamíferos complejo 2
NFκ-B	Factor nuclear kappa B
NK	Células asesinas naturales
NOD's	Receptores de dominio de oligomerización de unión de nucleótidos
PAMP'S	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
SH	Suero humano
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Toll like receptors
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
U.S.A	United State of America
VVH-8	Virus herpes humano tipo 8
LLR	Regiones repetidas de Leucina

Resumen

Introducción: Los macrófagos son células fagocíticas es el sensor primario de señales de daño endógeno y exógeno, su diferenciación se encuentra definida por el contexto celular y el tejido en que se encuentran. Son clasificados de acuerdo a la función y fenotipo que presentan; pueden ser denominados como M1, cuyas funciones están orientadas a la eliminación de patógenos intracelulares y propiedades citotóxicas, o M2, los cuales participan en la defensa contra parásitos, la reparación de tejidos y la producción de citocinas anti-inflamatorias. La plasticidad del macrófago permite ser re-polarizado después de la estimulación con citocinas y patógenos intracelulares como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Toxoplasma gondii*. Recientemente se ha documentado que la activación de la autofagia inducida por rapamicina durante la diferenciación de los macrófagos modifica su fenotipo. En este trabajo analizamos el fenotipo de los macrófagos humanos estimulados con rapamicina. **Material y métodos:** Obtuvimos macrófagos diferenciados hacia M1 y M2 de 22 paquetes leucocitarios del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”. Evaluamos su fenotipo mediante citometría de flujo y cuantificamos la producción de TNF- α por ELISA. Se determinó la inducción de la autofagia con rapamicina y LPS durante 24 y 48 horas, para medir la autofagia por citometría de flujo utilizamos la sonda Cyto-ID. **Resultados:** Nuestros resultados indican que ambos tipos de macrófagos producen TNF- α , aunque la producción de los macrófagos M2 es menor en comparación a los M1. La morfología redondeada se conserva en los M1, mientras que en los M2 se modifica a una forma de aguja. Encontramos que los macrófagos M1 realizan autofagia dependiente de la estimulación con rapamicina y LPS y no los macrófagos M2, aunque no observamos cambios en el fenotipo dependientes de la misma.

Palabras clave: macrófagos, M1, M2, fenotipo, autofagia, rapamicina.

Antecedentes

Introducción

La autofagia es un proceso altamente conservado en mamíferos y levaduras, donde parte del citoplasma, organelos y proteínas dañadas son encerradas en una estructura de doble membrana conocida como autofagosoma, el cual después se unirá al lisosoma para degradar y reciclar el contenido (Fabri *et al.*, 2011; Jo Shin, and Choi, 2012; Deretic, 2012). La autofagia es una vía de respuesta al estrés celular; regula el crecimiento de la célula, degrada compuestos tóxicos (agregados de proteínas, antígenos virales o propios) también es un mecanismo de eliminación directa de patógenos (Delgado *et al.* 2008; Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine 2010).

Los principales estímulos de activación de la autofagia incluyen el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP'S), señales de daño celular, el estrés, la hipoxia, la disminución o aumento de la temperatura e inhibición del receptor de rapamicina en mamíferos (mTOR). Específicamente en mamíferos la autofagia es promovida por la inhibición del receptor mTOR, este complejo se encuentra encargado de la regulación del crecimiento celular, el mantenimiento de la homeostasis y la supervivencia de la célula (Weichhart et al. 2008). Farmacológicamente la rapamicina es utilizado como inmunosupresor en inmunoterapias, trasplantes de órganos y tratamiento de enfermedades proteíno-degenerativas (Thomson, Turnquist, and Raimondi 2009).

En contraste con su función como inmunosupresor, la autofagia ha ganado interés debido a que la generación de vesículas degradativas permite eliminar patógenos de localización citoplásmica. Este fenómeno se ha observado en células fagocíticas profesionales como lo son neutrófilos, células dendríticas, células epiteliales y macrófagos. Los macrófagos son las células más estudiadas debido a que se encargan de regular el nivel de inflamación, la presentación de antígenos vía MHC II, de limpiar y reciclar restos celulares, proteínas y desechos que afecten el equilibrio homeostático de la célula. Adicionalmente, los macrófagos pueden servir como nicho de crecimiento de patógenos intracelulares, por ejemplo *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*,

Mycobacterium marinum, *Listeria monocytogenes*, *Streptomyces pyogenes*, *Samonella typhimurium*, *Legionella pneumophila*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus areous*, *Bruxiella abortus*, *Cryptococcus neoformans* y *Coxiella burnetii* (Gutierrez et al. 2004; Biswas et al. 2008; O. Amer and Swanson 2006; Dorn and Dunn 2001; Nakagawa, I. 2004; Davis, Tsang, and Qiu 2013); estos patógenos se adaptan a la maquinaria de defensa del macrófago y dentro del fagosoma impiden la fusión con el lisosoma, asegurando su replicación y supervivencia.

La autofagia es un mecanismo alternativo que puede ser utilizado por las células para eliminar patógenos intracelulares. Gutiérrez, *et al* (2004) documentaron la importancia de la autofagia como mecanismo de la defensa innata ante la infección en macrófagos humanos con *M. bovis* y *M. tuberculosis*, y Fabri, *et al* (2011) aportaron evidencia de que la inhibición del complejo mTOR por rapamicina en macrófagos y la inducción mediada por IFN- γ estimula la producción del péptido antimicrobiano catelicidina reduciendo la viabilidad en *M. tuberculosis* (Biswas et al. 2008). Es posible que la función que la rapamicina ejerce sobre la respuesta inmune sea dependiente del contexto celular en que actúa.

2. Sistema inmune

El sistema inmune es el encargado de realizar la defensa del organismo y lo protege contra agentes infecciosos y patógenos. Se ha dividido para su estudio en dos sistemas básicos, inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa del cuerpo, se conforma de barreras bioquímicas (citocinas y proteínas), físicas (epitelios y sustancias sintetizadas en la superficie de los epitelios) y celulares (células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos y células natural killer) (Abbas, A., and Lichtman 2006; Khanna 2011). La inmunidad adaptativa comienza con el reconocimiento de antígenos por linfocitos T. La acción de los linfocitos T requiere la participación de otras células como los macrófagos, la acción de los mecanismos de ambos tipos celulares determinarán el nivel de inflamación durante la respuesta adaptativa (Labonte and Hahn 2014).

2.1. Monocitos

Los monocitos son células de origen mieloide, su tamaño aproximado varía entre 12 a 20 μm , constituyen 1-6 % de todas las células sanguíneas nucleadas en condiciones fisiológicas, presentan una morfología redonda, un núcleo en forma de riñón y su citoplasma contiene un alto número de lisosomas que le da apariencia granulosa (Mosser and Edwards 2008; Piedras Claudio 2010). Los monocitos se localizan virtualmente en todos los tejidos y se encuentran indiferenciados en circulación en sangre periférica, este estado permanece por un período aproximado de 24h. Una vez que los monocitos se han establecido en un tejido y dependiendo de las señales recibidas del microambiente (citocinas, hormonas, proteínas y factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófagos) se lleva a cabo la maduración hacia macrófagos o células dendríticas

2.2. Macrófagos

Los macrófagos son las células fagocíticas esenciales para la defensa del hospedero, sin la acción de esta población celular el hospedero sucumbiría rápidamente a la infección (Labonte and Hahn 2014), son el sensor primario de daño endógeno, presentadoras de antígenos, además son la población encargada de limpiar, reciclar restos celulares, proteínas y desechos celulares que mantienen el equilibrio homeostático dentro del organismo (Abbas, A., and Lichtman 2006; Khanna 2011). Los macrófagos se encuentran en casi todos los tejidos, poseen una alta plasticidad que les permite adquirir propiedades fenotípicas y funcionales particulares dependiendo en el tejido en el que se encuentren.

2.2.1. Polarización de los Macrófagos

La diferenciación de monocitos hacia macrófagos es determinada por estímulos del tejido en el cual concluyen su maduración, un ejemplo son los macrófagos Kupffer y alveolares, los cuales expresan, receptores de membrana específicos dependiendo del lugar dentro del tejido en donde se encuentren, además de modificar su función fisiológica y su morfología (Laskin, Weinberger, and Laskin 2001). Los macrófagos presentan cambios en su fenotipo

dependientes de las señales del microambiente, el cual es ilustrado en un espectro continuo de los diferentes estados de activación del macrófago (Cassetta, Cassol, and Poli 2011; Passlick, Flieger, and Ziegler 2014). Existen dos fenotipos representativos con morfología y funciones fisiológicas opuestas, los cuales se denominan M1 y M2 (Figura 1).

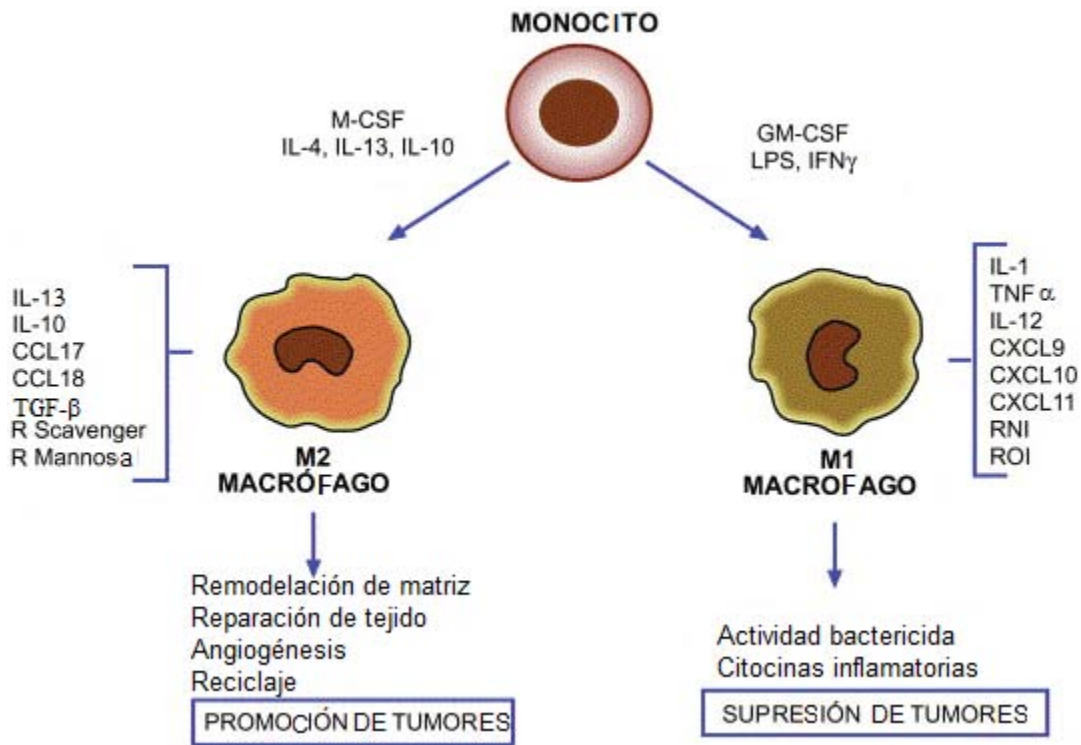


Figura 1. Esquema de diferenciación del monocito hacia macrófago. La diferenciación del monocito se encuentra determinada por el estímulo proporcionado por el contexto celular y tejido en el que se ubica. Los M1 tienen un perfil pro-inflamatorio, son activados con la estimulación de citocinas como IFN- γ , LPS, TNF- α y GM-CSF, aumentan la expresión de citocinas IL-1b, IL-6, IL-12, IL-13, CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11, especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno y TNF- α . También se asocian a la supresión de tumores debido a su alta capacidad fagocítica. Los M2 tienen un perfil anti-inflamatorio, su activación es promovida por IL-4, IL-10, IL-13, M-CSF y TGF- β , además aumentan la expresión de citocinas como IL-10, IL-13, CCL1 y TGF- β , además se encuentran asociados a la promoción de tumores.

Imagen modificada de Quatromoni, J.G. & Eruslanov, E., 2012. Tumor-associated macrophages: funcion, phenotype and link to prognosis in human lung cancer.

Las macrófagos M1 tienen un perfil pro-inflamatorio, son activados mediante la vía clásica (CAMØ) principalmente por citocinas como IFN- γ , TNF- α y GM-CSF. La activación por IFN- γ induce la transcripción de TNF- α , quien actúa de manera autocrina, además de las citocinas ya mencionadas para la obtención de macrófagos M1, es la estimulación con lipopolisacárido (LPS) a través del receptor tipo toll 4 (TLR 4), el cual induce la transcripción de STAT-1, NF- κ B y MAPKs (Edwards et al. 2009). Morfológicamente los macrófagos M1 son células redondeadas y presentan marcadores de membrana en niveles elevados de HLA-DQ, HLA-DR, CD71, CD86, CD14, CD16, CD32 y CD64, además de un aumento notable en la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, TNF- α , CXCL 3, CXCL 9 y CXCL 10 . La función de estos macrófagos activados clásicamente se orienta a un mayor procesamiento y presentación de antígenos vía MHC-II, además de un aumento en la eficacia en la eliminación de parásitos intracelulares (Lawrence and Natoli 2011), a través de procesos de degradación como la autofagia. Los macrófagos M1 se activan durante la respuesta inmune innata, confieren estabilidad ante la defensa del hospedero contra patógenos, pero la alta actividad microbicida produce la muerte indiscriminada de células del hospedero, lo que predispone al hospedero a nuevas invasiones.

Los macrófagos que presentan un fenotipo M2 son activados mediante la vía alternativa (AAMØ) principalmente por citocinas como IL-4, IL-10, IL-13, M-CSF, TGF- β . Presentan un perfil de expresión de citocinas anti-inflamatorio, aumentando la expresión de receptores de manosa (CD206), aumenta la producción de glucocorticoides, fibronectina, proteína de matriz extra celular β IG-H3, IL-10, AMAC-1 y TGF- β (Sierra, Filardi 2010), disminuye drásticamente la expresión de CD14, CD163 y presentar morfología en forma de aguja. Sus principales funciones son secreción de colágena, remodelación de tejidos y angiogénesis (Edwards et al. 2009; DeLisa Fairweathera 2009)(Tabla1).

Tabla 1. Los macrófagos M1 y M2 presentan propiedades antagónicas.

	Macrófagos M1	Macrófagos M2
Vía de activación	Clásica CAMØ Con la estimulación de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α y GM-CSF	Alternativa AAMØ Con la estimulación de IL-4, IL-10, IL-13, M-CSF, TGF- β
Citocinas y proteínas secretadas	IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, TNF- α , CCL 3, CCL 10 CCL 20 CXL 9 y CXCL 10, CXCL 11, iNOS	Glucocorticoides, fibronectina, proteínas de matriz extra celular β IG-H3, IL-10, AMAC-1 TGF- β ,
Marcadores de membrana	HLA-DQ, HLA-DR, CD71 CD86, CD14, CD16, CD32 y CD64.	Receptores scavenger CD209, CD36, CCRX4, receptor de manosa (CD206), CCL1, LIGHT, SPHK1, MS-1HMWP, CD163
Funciones	Aumenta la actividad anti-microbica, eliminación de parásitos intracelulares, además el macrófago es orientado hacia funciones de tipo pro inflamatorias y produce efecto anti-proliferativo.	Mayor producción de colágena, mayor capacidad de reparación tisular y capacidad endocítica, angiogénesis, esencialmente actividad anti inflamatoria, inmuno-reguladora. Se asocian a la eliminación de helmintos.
Morfología	Redondeada	Aguja

CAM \emptyset vía clásica de activación de Macrófagos; AAM \emptyset activación alternativa de Macrófagos

Los macrófagos M2 también conocidos como “macrófagos reguladores” aumentan La presente tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Esmeralda Juárez Carvajal en el Departamento de Investigación en Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER). La autora agradece la beca de titulación 2014 recibida de la Secretaria de Educación Pública (SEP).

la producción de glucocorticoides, responden al estrés e inhiben la respuesta inflamatoria del hospedero produciendo TGF- β (Lawrence and Natoli 2011), lo que aumenta la producción de linfocitos T reguladores. Se ha relacionado a los macrófagos M2 con infecciones virales, bacterianas y fúngicas, por ejemplo se describió que parásitos como *Tripanosoma* modifican la expresión de antígenos en la membrana del macrófago M1 generando inmunocomplejos, los cuales inducen la polarización hacia macrófagos M2 que le permiten a este parásito sobrevivir y replicarse. La des-regulación de la producción de IL-10 se ve reflejada en un aumento de macrófagos reguladores que favorece la propagación de parásitos intracelulares y además se han asociado a la progresión de neoplasias (Martinez and Gordon 2014).

La importancia de conocer los mecanismos que conllevan la polarización de los macrófagos dependientes del contexto, ha resultado de interés debido a la búsqueda de aplicaciones terapéuticas, aprovechando la producción de citocinas pro-inflamatorias y la citotoxicidad de las células. Sin embargo, el estudio de la diferenciación de macrófagos resulta de difícil monitoreo debido a la inexistencia de marcadores que identifique exclusivamente a cada subpoblación, en algunos casos el fenotipo de los macrófagos diferenciados sufre modificaciones que les permiten desarrollar funciones antagónicas a las iniciales (Mosser and Edwards 2008).

Los ensayos realizados *in vitro* muestran diferencias entre ambas poblaciones con respecto a la producción de citocinas específicas, se ha demostrado que los M1 no producen IL-10 y aumentan la producción de IL-12, lo que ocurre en caso contrario con los M2, no obstante los estudios *in vivo* han demostrado que la producción de IL-10 por parte

de los M1 no se encuentra totalmente inhibida, esto se debe a que el estado de diferenciación se “altera” al recibir una segunda estimulación modificando el fenotipo, este efecto es conocido como tolerancia a endotoxinas y da como resultado de un cambio en el programa de expresión de genes provenientes del fenotipo M1 hacia fenotipo M2 (Cassetta, Cassol, and Poli 2011). La heterogeneidad y plasticidad de los macrófagos es una importante herramienta que busca emplearse para la manipulación de la dirección de la polarización, (Lawrence and Natoli 2011) permitiendo al macrófago atravesar diferentes estados funcionales según se requiera.

Para realizar el análisis de fenotipo de macrófagos M1 y M2 se realizó la búsqueda de marcadores que distinguieran a ambas subpoblaciones. A continuación en la tabla 2 se muestran los receptores empleados para el análisis de fenotipo en macrófagos, así como una descripción de su función.

Tabla 2. Marcadores celulares para los cuales utilizamos anticuerpos específicos para evaluar la diferenciación de macrófagos.

Marcador	Ligando/receptor	Características
CD14	LPS	Su peso molecular es de 53 kDa. Se une al complejo de LPS y es un receptor requerido para la activación de macrófagos. Participa en la regulación positiva de endocitosis, procesos apoptóticos, regulación positiva en la secreción de citocinas, regulación positiva en la producción de TNF- α , etc.
CD16	Agregado del complejo IgG, complejo IgA	Su peso molecular es de 50-70 kDa. Participa en la activación celular inducida por inmunocomplejos ; citotoxicidad celular

		dependiente de anticuerpos
CD36	Lipoproteínas LDL oxidadas, Trombopostina y colágeno	<p>Su peso molecular es de 85-90 kDa. Su principal función se encuentra en la adhesión celular, transducción de señales y regulación de angiogénesis. Es un receptor scavenger de lipoproteínas oxidadas de baja densidad y células apoptóticas (restos celulares).</p> <p>Se localiza en membrana de plaquetas, monocitos, macrófagos y células endoteliales</p>
CD62L	GlyCAM-1	Es una molécula de 74-95 kDa perteneciente a la familia de las selectinas. Su función es adhesión entre leucocitos y endotelio; buscador de linfocitos T vírgenes en ganglios linfáticos periféricos
CD163	Hemoglobina y complejo de haptoglobina	Su peso molecular es de 130 kDa, es un receptor scavenger de tipo B (rico en cisteínas), interactúa directamente con CSNK2B.
CD206	Antígenos con residuos de manosa	De peso molecular 162 kD, pertenece a la familia de receptores de manosa, familia de receptores tipo lectina C, se une a oligosacáridos ricos en manosa de los microorganismos, es un receptor de reconocimiento de patrón del sistema inmunitario innato

La importancia en el mantenimiento y la plasticidad del fenotipo de macrófago, no solo en condiciones homeostáticas sino especialmente en determinadas patologías, requiere la caracterización de los factores que la pueden modificar (Kawanishi et al. 2010). La fagocitosis y eliminación de patógenos en macrófagos es llevada a cabo exclusivamente por los M1, donde por vía endo-lisosomal los patógenos intracelulares son eliminados, pero existen patógenos que han desarrollado formas de escape a estos procesos lisosomales (Jo, Shin, and Choi 2012). Uno de los mecanismos de eliminación directa de patógenos intracelulares es la autofagia, la cual también es un proceso ligado a homeostasis que podría modificar el fenotipo del macrófago.

3. Autofagia

La autofagia es una vía de respuesta al estrés celular, es el mecanismo de eliminación directa de bacterias y supervivencia de la célula a través del cual se degradan compuestos tóxicos del citosol y organelos, además es una vía reguladora de homeostasis de energía, control en el crecimiento celular, inflamación, también se involucra en el mantenimiento de la reserva de aminoácidos y la producción de nutrientes durante la deprivación (Hansen and Johansen 2011).

La autofagia es un proceso conservado desde las levaduras hasta los metazoarios (Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine 2010), consiste en la elongación eventual y fusión de la membrana para la formación del autofagosoma¹, que subsecuentemente se unirá con un lisosoma para formar el autofagolisosoma, finalizando con la degradación del contenido celular y reciclando las macromoléculas resultantes. (Figura 2) (Mizushima 2007). Este proceso fue caracterizado en 1950 durante el estudio de *Saccharomyces cerevisiae* donde se observó por vez primera la formación del autofagosoma y la presencia de los genes ATG (por sus siglas en inglés AuTophagy-related)(Klionsky 2012). Los genes responsables de

¹ Vesícula de membrana aislada, donde se encierra una porción del citoplasma formando una de doble membrana

la activación y formación de las vesículas autofágicas son los genes ATG, los cuales son genes conservados dentro de la línea evolutiva, en organismos como *Drosophila* y algunas levaduras se ha encontrado que la inducción comienza con la activación y transducción del gen ATG-1 y reclutamiento de múltiples proteínas, las cuales son fosforiladas para iniciar la formación del autofagosoma, mientras que en mamíferos la activación se lleva a cabo mediante la transcripción de genes homólogos (Congcong He and Daniel J. Klionsky 2010).

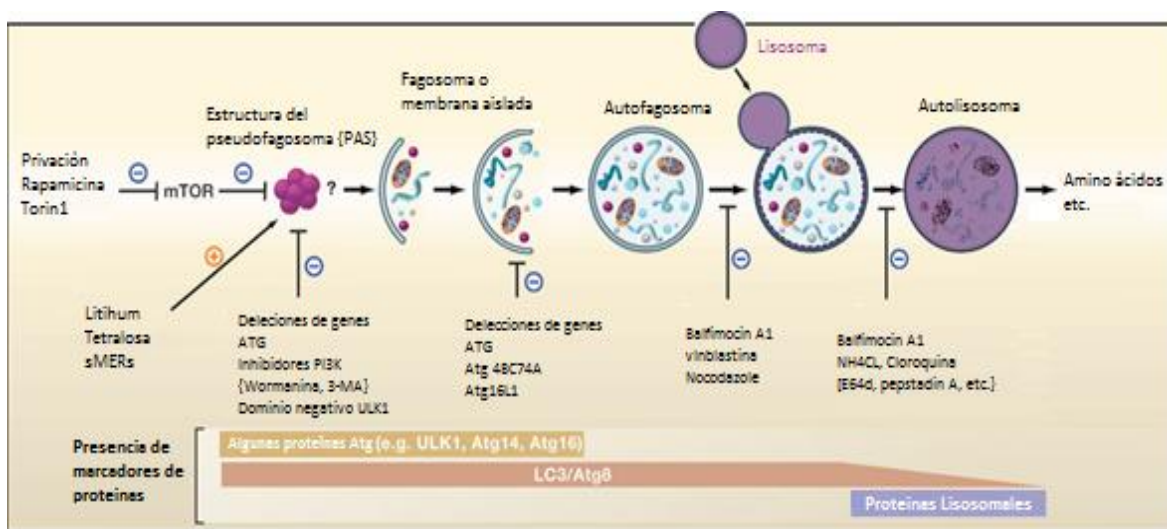


Figura 2. Vía de activación de la autofagia. El proceso de autofagia se encuentra principalmente regulado por el complejo mTOR, el cual es inhibido por la estimulación de rapamicina o Torin1. La rapamicina es el antibiótico con el mayor número de estudios, debido a su aplicación como adyuvante en inmunoterapias.

Imagen modificada de Mizushima, N., et al, 2010 Methods in mammalian autophagy research

La activación de la autofagia mediante la inhibición del complejo TOR por el fármaco rapamicina ha comenzado a ganar interés como adyuvante en terapias, siendo implementado como inmunosupresor durante el trasplante de órganos (Figura 3). La rapamicina es antibiótico macrólido producido por el actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus*, el cual tiene un efecto positivo dentro de la autofagia promoviendo el aumento en el aislamiento de membrana, número de autofagosomas y autofagolisosomas. En mamíferos el complejo mTOR censa el crecimiento, proliferación, supervivencia,

suministra la producción de aminoácidos y nutrientes, su actividad es regulada por varios factores de crecimiento y señales celulares (Sumpter and Levine 2010). Se constituye de una subunidad catalítica con dos distintos complejos multi-proteicos mTORC1 y mTORC2, los cuales regulan negativamente la autofagia (Thomson, Turnquist, and Raimondi 2009). Otros receptores de la respuesta innata estudiados en el proceso de autofagia son los receptores tipo Toll (TLR's) y receptores de dominio de oligomerización de unión de nucleótidos (NOD), los cuales son principalmente la vía de interacción con los PAMP's. Las proteínas NOD son receptores citoplasmáticos implicados en el reconocimiento de moléculas de bacterias, la proteína NOD2 tiene una mayor afinidad para la detección de muramildipetido de la pared bacteriana, la cual desencadena la cascada de activación de respuesta del sistema inmune (caspasa -1 y citocinas pro-inflamatorias). NOD1 es una proteína que tiene una similitud estructural y funcional a NOD2, tiene dominios de reclutamiento de caspasas (CARD), (Juárez et al. 2012; Ogura et al. 2001) un ejemplo es la función que desempeña NOD2 al iniciar la cascada de activación en respuesta *M. tuberculosis* y favoreciendo la resolución de la infección.

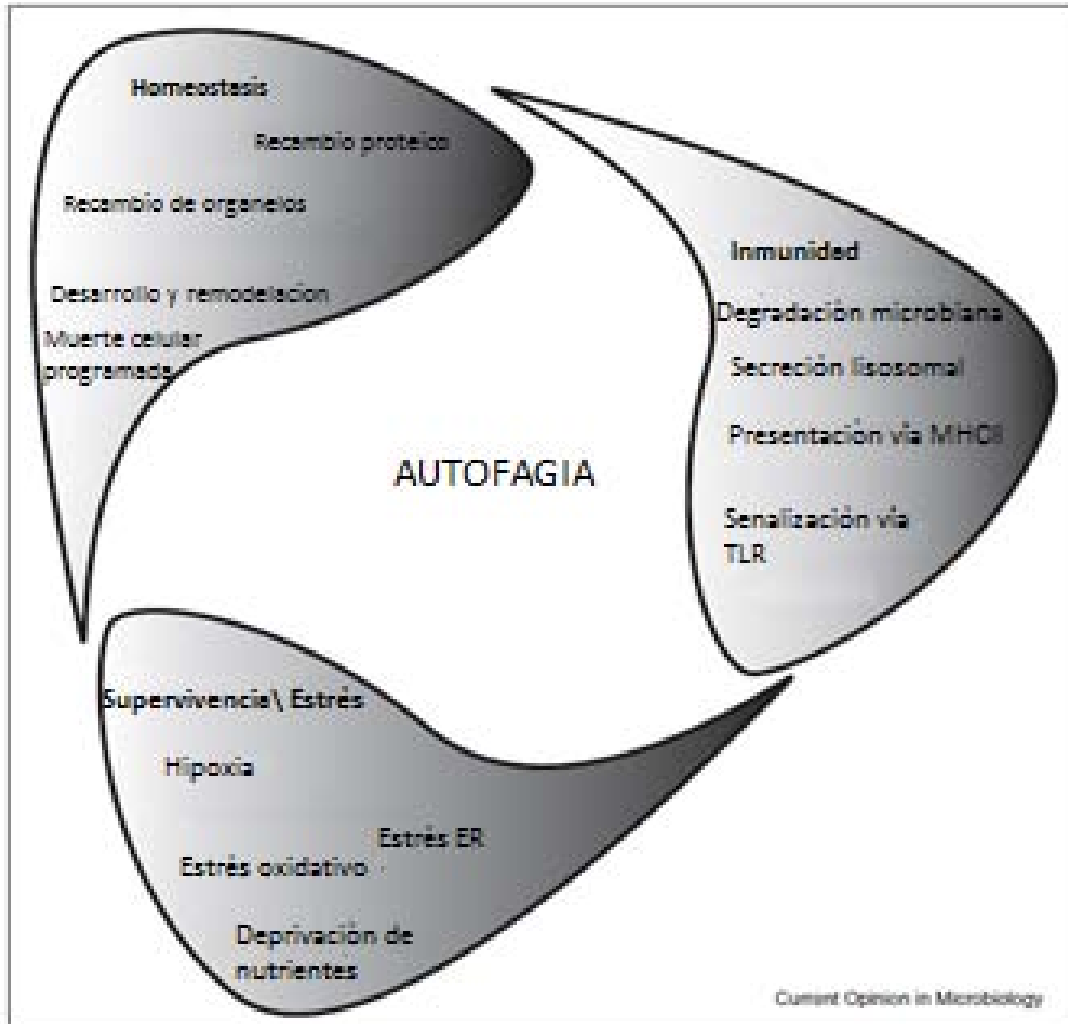


Figura 3. Importancia de la vía de la autofagia en la supervivencia de la célula. La autofagia es parte importante en el mantenimiento de la homeostasis, supervivencia de la célula, regulación del estrés celular e inmunidad. Dentro de la inmunidad la autofagia es utilizada como mecanismo directo de eliminación de patógenos intracelulares, señalización vía TLR y presentación de péptidos vía MHCII, lo cual permite que la autofagia sea empleada como blanco terapéutico.

Imagen modificada de Shahnazari, S. Brumell, H., 2001, Mechanisms and consequences of bacterial targeting by the autophagy pathway

Estudios recientes sugieren que la activación de la autofagia interviene regulando la polarización de células mieloides fagocíticas (dendríticas y macrófagos) (Mercuri et al. 2013). Adicionalmente se ha documentado que la inhibición del complejo mTOR por rapamicina interviene en la producción de IL-12, IL-10 e inhibe la transcripción del factor NF- κ B además detiene la activación de células Th1 y Th17.(Weichhart et al. 2008) En modelos *in vitro* de rata y ratón se ha encontrado que la autofagia promovida por rapamicina interviene de manera directa en la activación del macrófago pero no en la supervivencia (Danner et al. 2008). Actualmente no existen estudios en monocitos y macrófagos humanos sobre los efectos de la activación de la autofagia por rapamicina sobre macrófagos activados.

Justificación

La orientación en la diferenciación del macrófago M1 y M2 es utilizada como herramienta en la aplicación de terapias alternativas (Sica and Mantovani 2012) e inmunoterapias en trasplantes de hígado y páncreas, además de enfermedades crónicas degenerativas como úlceras venosas en las piernas, cáncer y diabetes (Mantovani, Sica, and Locati 2005; Sindrilaru et al. 2011; Danner et al. 2008). Recientemente se documentó la activación de la autofagia por rapamicina durante la diferenciación de los macrófagos en pacientes con diabetes, modifica el fenotipo de los macrófagos M1 (Mercuri et al. 2013). Esto indica que la rapamicina tiene usos potenciales para la orientación del fenotipo de los macrófagos y puede ser una nueva estrategia para combatir enfermedades crónicas degenerativas en el tratamiento contra patógenos (Mostowy and Cossart 2012). Debido a que se desconoce si la activación de la autofagia por rapamicina modifica el fenotipo del macrófago activado, en este trabajo investigamos este fenómeno.

Hipótesis

La activación de la autofagia por rapamicina induce cambios en el fenotipo del macrófago M1 o M2.

Objetivo

Inducir autofagia en macrófagos diferenciados a M1 y M2 con rapamicina y determinar si se inducen cambios en el fenotipo.

Objetivos específicos

- Evaluar el fenotipo de los macrófagos durante el proceso de diferenciación.
- Establecer el panel de marcadores de fenotipo M1 y M2.
- Determinar la inducción de autofagia por medio de una tinción de citometría de flujo.
- Evaluar los cambios en el fenotipo de macrófagos estimulados con rapamicina a las 24 y 48h.

Metodología

Obtención de monocitos

Los monocitos se obtuvieron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provenientes de 22 paquetes leucocitarios de donadores sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”. Los PBMC se obtuvieron a través de gradiente de densidad, las muestras de sangre se diluyeron 1:1 con medio RPMI 1640 (Lonza, Walkersville MD, USA) suplementado con 1mg/ml de Gentamicina (Lonza, Walkersville MD, USA) y 10mM de glutamina (Lonza, Walkersville MD, USA) en adelante denominado RPMI G+g. Se estratificó con Solución separadora de linfocitos (Lonza, Walkersville MD, USA) 4:1 y se procedió a centrifugar durante 45 minutos a 1200 rpm sin freno y a temperatura ambiente. Después se colectó el anillo leucocitario, el cual se transfirió a un tubo cónico de 50 mL, se lavó con medio RPMI G+g y se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm a 4°C tres veces.

Terminado el lavado, se procedió a re-suspender las células en 40 mL de medio RPMI G+g complementado con 10% de suero humano (SH, Valley Biomedical, Winchester, VA, USA). Las células se distribuyeron en placas de poliestireno de 100 mm (Corning, Tewksbury MA, USA) y se incubaron durante 1h a 37°C 5% CO₂. Terminado el tiempo de incubación las placas fueron lavadas 3 veces con 5 mL medio RPMI G+g para eliminar las células no adherentes, y con ayuda de un cell lifter se levantó la monocapa de monocitos, se lavaron con 20 mL de medio RPMI 10% SH y centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos 4°C. Por último las células fueron re-suspendidas en medio RPMI 10% SH. Se ajustó la suspensión celular a 1×10^6 células/mL, y se cultivaron 0.5 mL/pozo en placas 24 pozos fondo plano de baja adherencia (Costar, St. Louis, MO).

Obtención y estimulación de macrófagos diferenciados en M1 y M2

Con la finalidad de estudiar el mayor número de macrófagos M1 y M2 diferenciados se utilizaron dos protocolos de diferenciación para cada tipo celular. Se cultivó 0.5×10^6 células/mL en placas de 24 pozos de baja adherencia durante 7 días en presencia de:

- 1.- 100 U/mL IFN- γ (R & D, Minneapolis, MN) para la obtención de macrófagos M1.
- 2.- 100 U/mL IFN- γ (R & D, Minneapolis, MN) + 50 ng/mL LPS (Sigma, St. Louis, MO) para la obtención de macrófagos M1.
- 3.- 40 ng/mL de IL-4 (R & D, Minneapolis, MN) para la obtención de macrófagos M2.
- 4.- 40 ng/mL de IL-4 + 50 ng/mL IL-10 (Pharmlingen, San José, CA) para la obtención de macrófagos M2.

Al quinto día de la diferenciación las células se re-estimularon con la mitad de la concentración de cada tratamiento. Obtenidos los macrófagos diferenciados se procedió a estimular con rapamicina 500 ng/mL (Sigma, St. Louis, MO) y LPS 100 ng/mL (Sigma, St. Louis, MO) durante 24 y 48 horas.

Determinación de autofagia y del fenotipo de los macrófagos por citometría de flujo

Después del tiempo de activación las células de cada pozo se re-suspendieron en su propio medio para desprender la monocapa y se centrifugaron a 2000rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se colectaron y se guardaron a -20°C . Se lavaron las células con PBS 1x, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, y se re-suspendieron en 1ml de PBS 1x conteniendo $1\mu\text{l}$ de una sonda de viabilidad (eBioscience, que se lee con el detector de APC) y se incubó por 20 min a 4°C . Se lavaron las células con PBS, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos, y se re suspendieron en 0.5 mL de CYTO-ID (Enzo, Farmingdale, NY), la cual es una sonda isotrópica que se une a los

autofagosomas [(Li-Ying, D.et al 2012; Manual 2011) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Terminado el tiempo de incubación se agregó PBS + 2% SFB y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Con la finalidad de caracterizar el mayor número posible de células obtenidas utilizamos dos paneles de tinción con 6 fluorocromos, tomando en cuenta el espectro de absorción y de emisión de cada flurocromo.

Se utilizaron dos paneles de marcadores para la caracterización de los macrófagos M1 y M2, se utilizó 0.5 µl de anticuerpo monoclonal de CD14 conjugado con PE-Texas Red por 5 x10⁵ células obtenidas y 1µl de anti human CD62L conjugado con APC/Cy7, anti human, CD16 conjugado con PerCy 7, anti human CD163 conjugado con APC y anti human CD36 conjugado con PerCP-Cy 5.5 por cada 5 x10⁵ células obtenidas.

Tabla 3. Configuración del primer panel de tinción.

Anticuerpo	Fluorocromo
CD14	PE-Texas Red
CD62L	APC/Cy7
CD163	APC
CD16	PerCy 7
CD36	PerCP-Cy 5.5
Cyto ID	Alexa 488

El segundo panel de tinción empleó 0.5 µl de cada uno de los siguientes anticuerpos monoclonales CD14 conjugado con PE-Texas Red (Invitrogen, Carlsbad, CA), anti human HLA-DR conjugado con Alexa 700 (Biolegend, San Diego, CA) por 5 x10⁵ células obtenidas y 1µl de cada uno de los siguientes anticuerpos monoclonales: anti human CD36 conjugado con PerCP-Cy 5.5 (BD pharmingen San José, CA) y anti human CD206

conjugado con APC/Cy7 (Biolegend, San Diego, CA por cada 5×10^5 células obtenidas (Tabla 4).

Tabla 4. Configuración del segundo panel de tinción.

Anticuerpo	Fluorocromo
CD14	PE-Texas Red
HLA-DR	Alexa 700
CD36	PerCP-Cy 5.5
CD206	APC/Cy7
CD16	PerCy 7
Cyto ID	Alexa 488

Después las células se incubaron por otros 15 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz, seguido de un lavado con PBS 1x (Lonza, Walkersville MD, USA). Las células se re-suspendieron en 0.3 mL de PBS 1x (Lonza, Walkersville MD, USA), de manera simultánea se realizaron los controles de compensación (más un control negativo) con perlas de compensación. En siete tubos previamente marcados se añadió una gota de perlas negativas y positivas, se añadió 0.2µl de cada anticuerpo utilizado. Se incubó durante 20 minutos a 4°C en oscuridad, terminado el tiempo de incubación se lavaron con 1mL de PBS 1x, se centrifugó a 2000rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió en 200 µl de PBS 1x.

Terminada la tinción, inmediatamente fueron llevadas al citómetro de flujo BD FACS Canto II (Becton Dickinson, San José, CA) y se adquirieron un mínimo de 50,000 eventos.

Estrategias de análisis de datos

a) Selección de células individuales viables

Después de la adquisición en el citómetro de flujo, se realizó el análisis de fenotipo en el programa FACS Diva (Becton Dickinson, San José, CA). En un gráfico de puntos o *dot plot* con los parámetros FSC-H (dispersión frontal de la altura) vs FSC-A (dispersión frontal en área) (Figura 4 **a**) seleccionamos la región de macrófagos individuales por tamaño, excluyendo del análisis a los dobletes de células. Posteriormente en un segundo dot plot con los parámetros SSC-H vs SSC-A (Figura 4 **b**), se seleccionó la región correspondiente a los macrófagos individuales por complejidad. A continuación se realizó un histograma en los macrófagos individuales con la sonda de viabilidad para seleccionar los macrófagos individuales vivos (Figura 4 **c**).

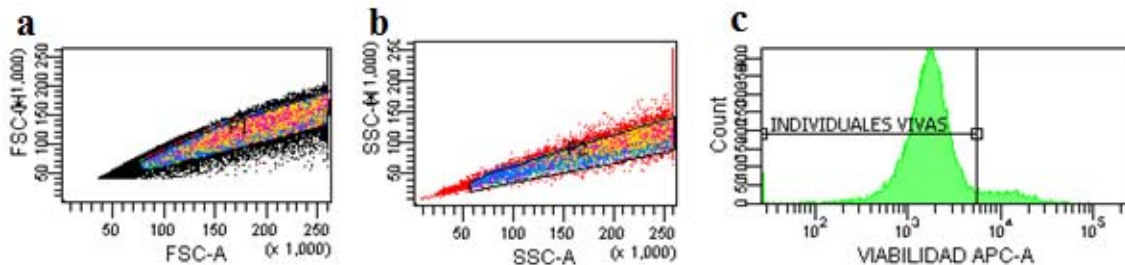


Figura 4. Selección de células individuales viables. Estrategia de la región para la selección de células individuales, se seleccionaron las individuales por tamaño (a) y después individuales por complejidad (b), de la región anterior y con la sonda de viabilidad se delimitaron las células individuales viables (c)

b) Cuantificación de autofagia

A partir de la selección de macrófagos individuales vivos en un dot plot graficamos el parámetro FSC-A vs CD14 PE-Texas Red para discriminar las células CD14+ y CD14-. En la población de macrófagos CD14+ realizamos un histograma con la sonda Cyto-ID para determinar el nivel de autofagia. (Figura 5)

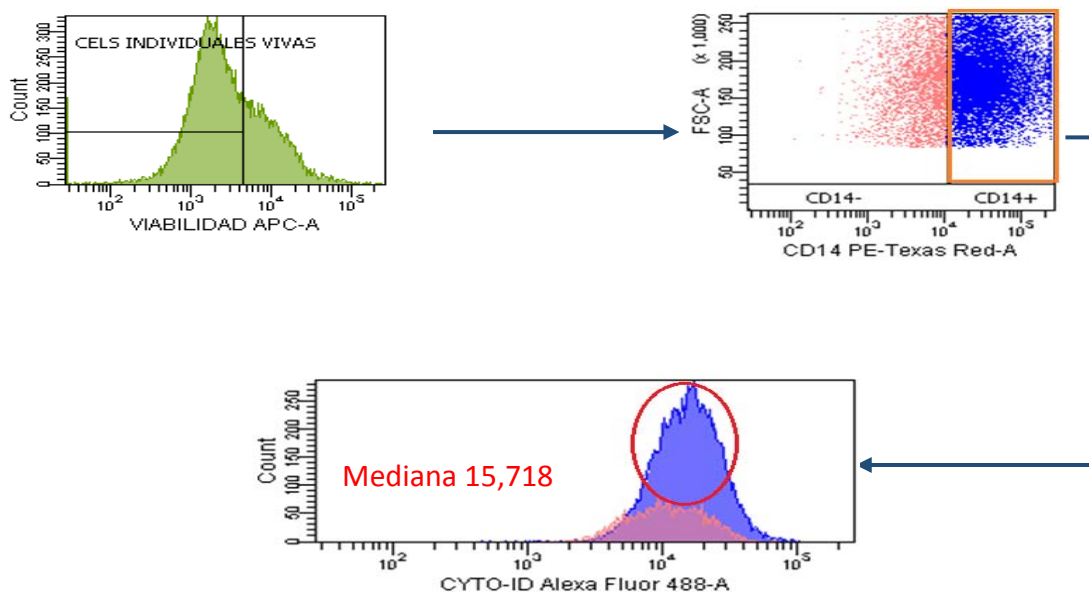


Figura 5. Cambio en la intensidad mediana de fluorescencia. A partir de la selección de células individuales vivas en un gráfico de puntos el porcentaje de células CD14+ y CD14-, el siguiente paso fue seleccionar la población de células CD14+ que realizan autofagia.

Para cuantificar el nivel de autofagia de los macrófagos utilizamos la sonda Cyto ID. El nivel de autofagia se expresa como el cambio en la intensidad mediana de fluorescencia (IMF), el cual se calcula como la diferencia de la IMF tubo con estimulación (rapamicina o LPS) con respecto del tubo sin estimulación, matemáticamente se expresa de la siguiente forma;

$$\text{IMF} = \frac{\text{IMF del tubo estimulado}}{\text{IMF del tubo sin estimulación}}$$

c) Determinación del fenotipo

Para caracterizar el fenotipo de las células obtenidas utilizamos dos combinaciones de cuatro y tres marcadores. La primera combinación de anticuerpos utilizado para la tinción empleo la siguiente estrategia de análisis, primero se identificaron a las células CD14+, en seguida los macrófagos CD14+ se analizó con los marcadores CD16 y CD62L, delimitando la región CD16-CD62L- (figura 6). La misma estrategia se utilizó para el análisis de los macrófagos CD14-.

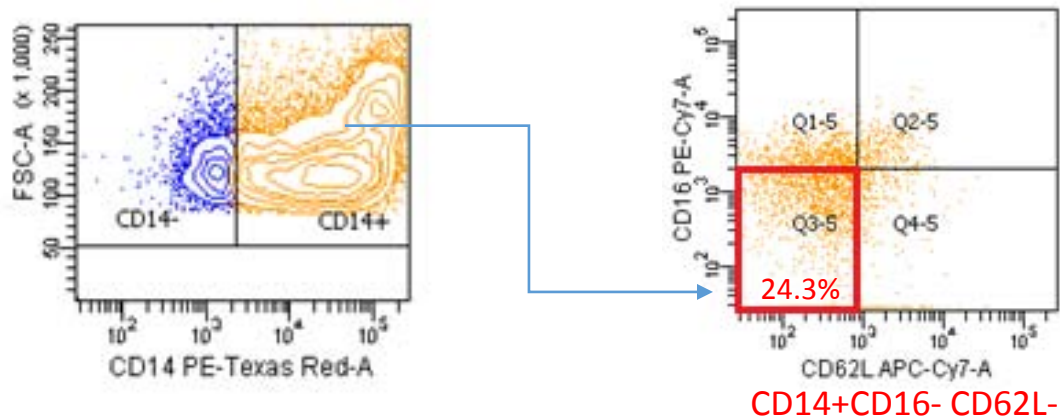
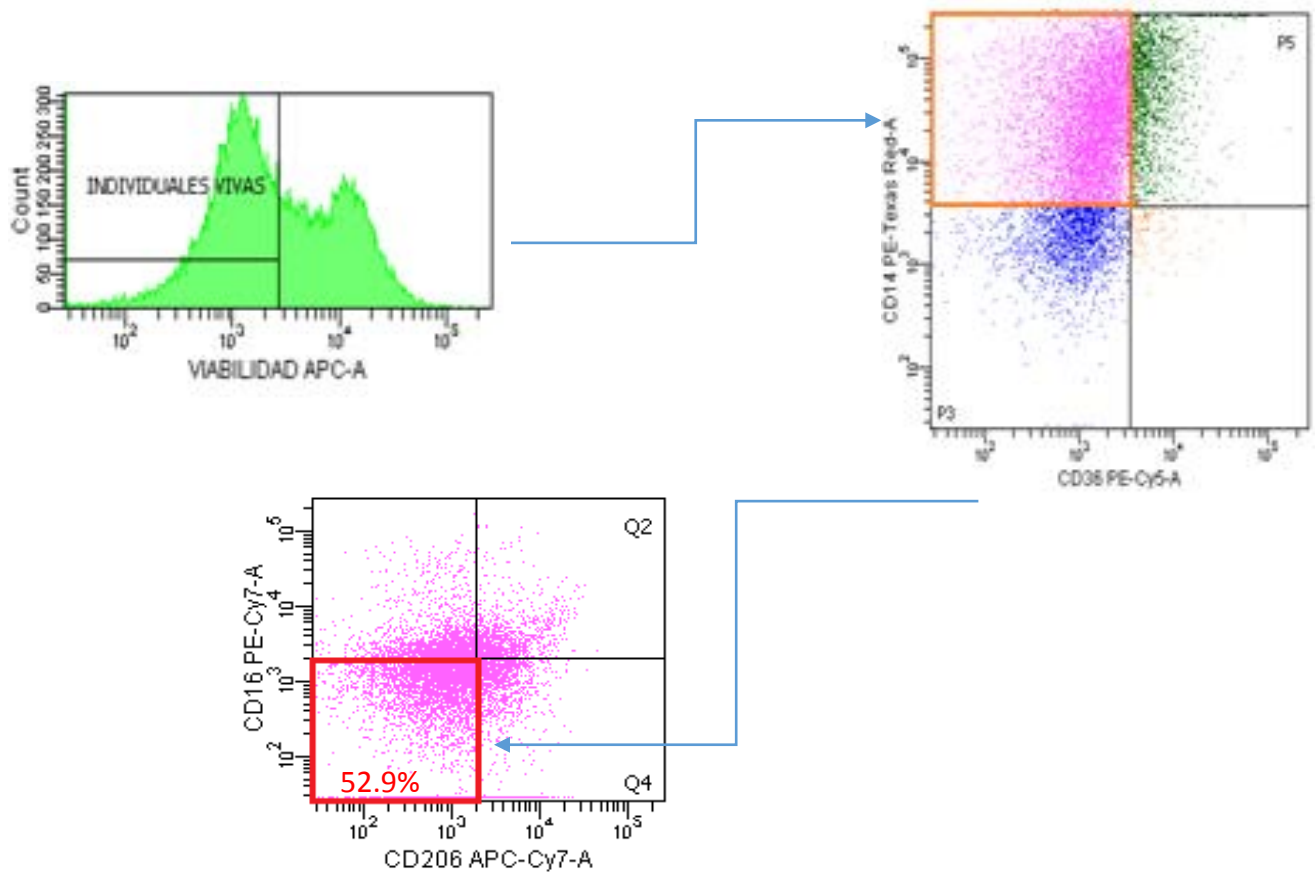


Figura 6. Estrategia de análisis de fenotipo para el primer panel de tinción. Para el análisis de fenotipo con el primer panel de anticuerpos, definimos el porcentaje de células CD14+ y CD14- , a partir de esta selección analizamos con los marcadores CD16 y CD62L, determinando el porcentaje de macrófagos CD14+ CD16-CD62L- en este ejemplo el porcentaje corresponde al 24.3%.

Para la segunda estrategia de análisis se graficaron los macrófagos individuales vivos con los marcadores CD14 y CD36, se delimitó la región CD14+CD36-. Con la región anterior se analizó con los marcadores CD16 y CD206 y se delimitó la región CD16-CD206- (figura 7). De manera similar se analizaron los macrófagos CD14-.



CD14+CD16-CD36-CD206-

Figura 7. Segunda combinación de marcadores. A partir de los macrófagos individuales vivos se graficó con los marcadores CD14 vs CD36, seleccionándose la población CD14+CD36-, el siguiente paso fue seleccionar analizar la población CD14+ CD36- con los marcadores CD16 y CD206 para seleccionar la región CD16-CD206-. Al final la población analizada tenía el fenotipo CD14+CD36-CD16-CD206-.

c) Cuantificación de TNF- α por ELISA

Con el sobrenadante obtenido durante la estimulación celular, se cuantificaron los niveles de producción de TNF- α por ELISA. En una placa maxisorp de 96 pozos (Nunc) sensibilizada con el anticuerpo de captura (anti human TNF- α purificado, Pharmingen) diluido 1:500 en PBS a 4°C toda la noche, se descartó la solución con anticuerpo y se lavó 3 veces con solución de lavado (PBS 0.01M pH 7.2- Tween-20 al 0.05%). Después se bloqueó la placa con Superblock (Pierce Endogen) a 37°C durante 30 minutos, pasado el tiempo de incubación se lavó 3 veces la placa y se adicionó por duplicado en cada pozo las muestras, los estándares y blancos y se incubó a 37°C por 2 horas.

Se lavó la placa 3 veces con la solución de lavado y se adicionó el anticuerpo secundario (anti human TNF- α h-biotina) diluido 1:1000 en PBS 0.01M pH 7.2- Tween20 0.05%- BSA 2% y se incubó a temperatura ambiente por 45min. Después de 6 lavados, se adicionó estreptavidina-fosfatasa alcalina (EAF, Jackson Immunoresearch) diluida 1:2000 en PBS 0.01M pH 7.2- Tween20 0.05%- BSA 2% y se incubó a temperatura ambiente por 30min. Se volvió a lavar la placa 6 veces y se adicionó el substrato de fosfatasa (Sigma Aldrich). Se dejó desarrollar la reacción (en oscuridad durante 20 minutos) y se midió en un lector de ELISA (Multiscan) a 405nm. Se calculó el promedio de la absorbancia de los duplicados, se calculó la concentración de acuerdo a la regresión lineal, los datos obtenidos se reportan en pg/mL.

Análisis estadísticos

Las gráficas y los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prisma 5.0. Los datos fueron graficados en diagramas de caja, se muestran en cuartiles y mediana. Los datos se analizaron utilizando el test de Wilcoxon para muestras pareadas. Se consideraron valores estadísticamente significativos cuando fue $p < 0.05$.

Resultados

Generación de macrófagos M1 y M2

En el presente trabajo utilizamos dos protocolos para diferenciar macrófagos M1 y dos para M2. Los macrófagos M1 son células productoras de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-12, IL-23 y TNF- α , mientras que los macrófagos M2 producen citocinas anti-inflamatorias como IL-10, CXCL 3 (Toribio 2008), disminuyendo la producción de citocinas pro-inflamatorias. Para confirmar que teníamos macrófagos polarizados hacia ambos fenotipos evaluamos la producción de TNF- α en respuesta a la estimulación con LPS. Se encuentra reportado que los M1 y los M2 responden diferencialmente a la estimulación con LPS (Albrecht 2006); los M1 producen niveles elevados de TNF- α y los M2 no lo hacen.

Nosotros encontramos que todos los tipos de macrófagos que generamos produjeron cantidades significativas de TNF- α (figura 8 **a** y **b**) en respuesta a la estimulación con LPS. No obstante, los macrófagos polarizados al fenotipo M1 produjeron cantidades mayores de TNF- α , específicamente en los casos donde los macrófagos fueron polarizados con IFN- γ (mediana 8834, rango 0-252000 pg/mL) los cuales tienen una mayor producción de TNF- α en comparación con los macrófagos polarizados con IFN- γ + LPS (Mediana 1274, rango 125.5-1427 pg/mL). Los macrófagos polarizados hacia M2 produjeron cantidades significativas de TNF- α respecto a las células sin estimular pero la producción fue significativamente menor con respecto a los M1 (Figura 8 **c** y **d**). Los macrófagos M2 polarizados con IL-4 (Mediana 2545.50, rango 1104-2703 pg/mL) produjeron cantidades menores versus M2 diferenciados con IL-4 + IL-10 (Mediana 823.08, rango 175.1-2703 pg/mL).

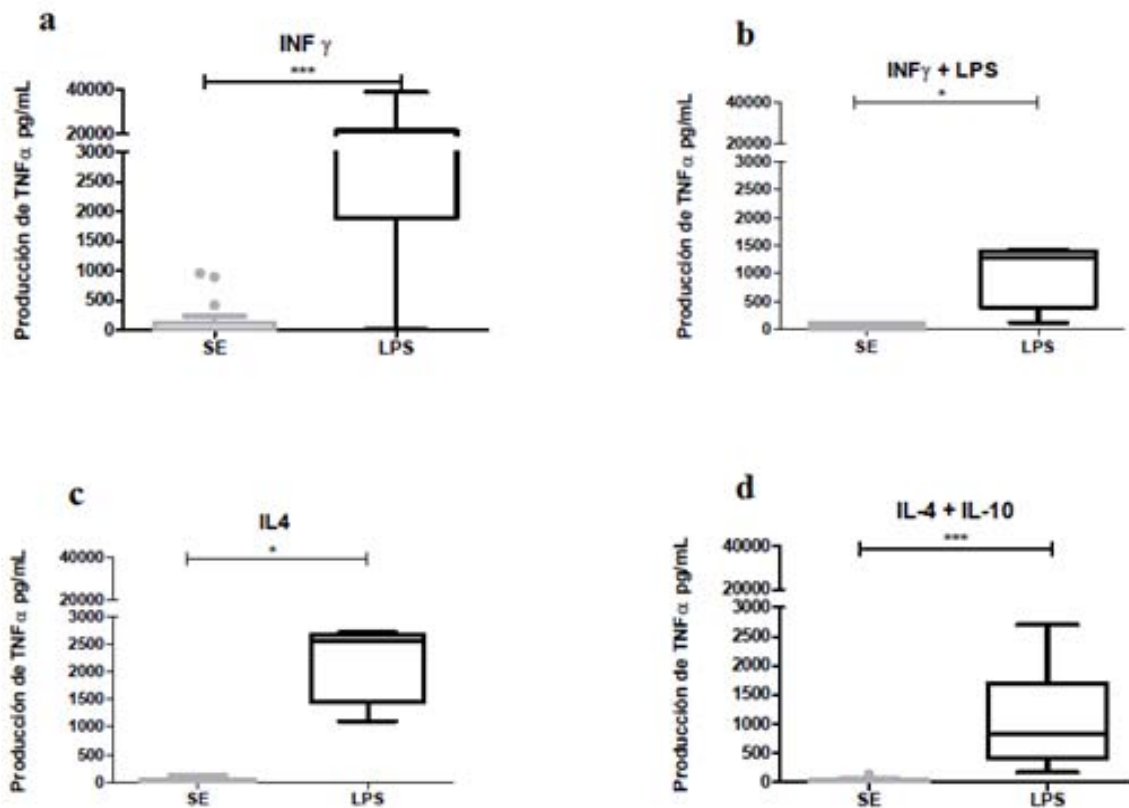


Figura 8. Producción de TNF α en respuesta a la estimulación con LPS. Los macrófagos fueron polarizados hacia M1 con 100 ng/ml de IFN- γ n= 34–39 (a) o con 100 ng/ml de IFN- γ + 100 ng/ml de LPS n=4 (b), y los macrófagos polarizados hacia M2 se estimularon con 40 ng/ml de IL-4 n=5-7 (c) o 40 ng/ml de IL-4 + 50 ng/ml de IL-10, n=18-20 (d) durante 7 días. Las células fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS durante 24h. Se determinó la cantidad de TNF- α presente en los sobrenadantes por ELISA *p<0.01, ***p<0.001.

Debido a que la función y morfología de los macrófagos depende directamente del microambiente en el que se encuentre, visualizamos en el microscopio de contraste de fases los macrófagos diferenciados M1 y M2, donde observamos las características morfológicas como elongación y formación de “agujas” en los M2 y morfología redondeada en los M1, la cual comparte con los macrófagos no activados M0. (Figura 9).

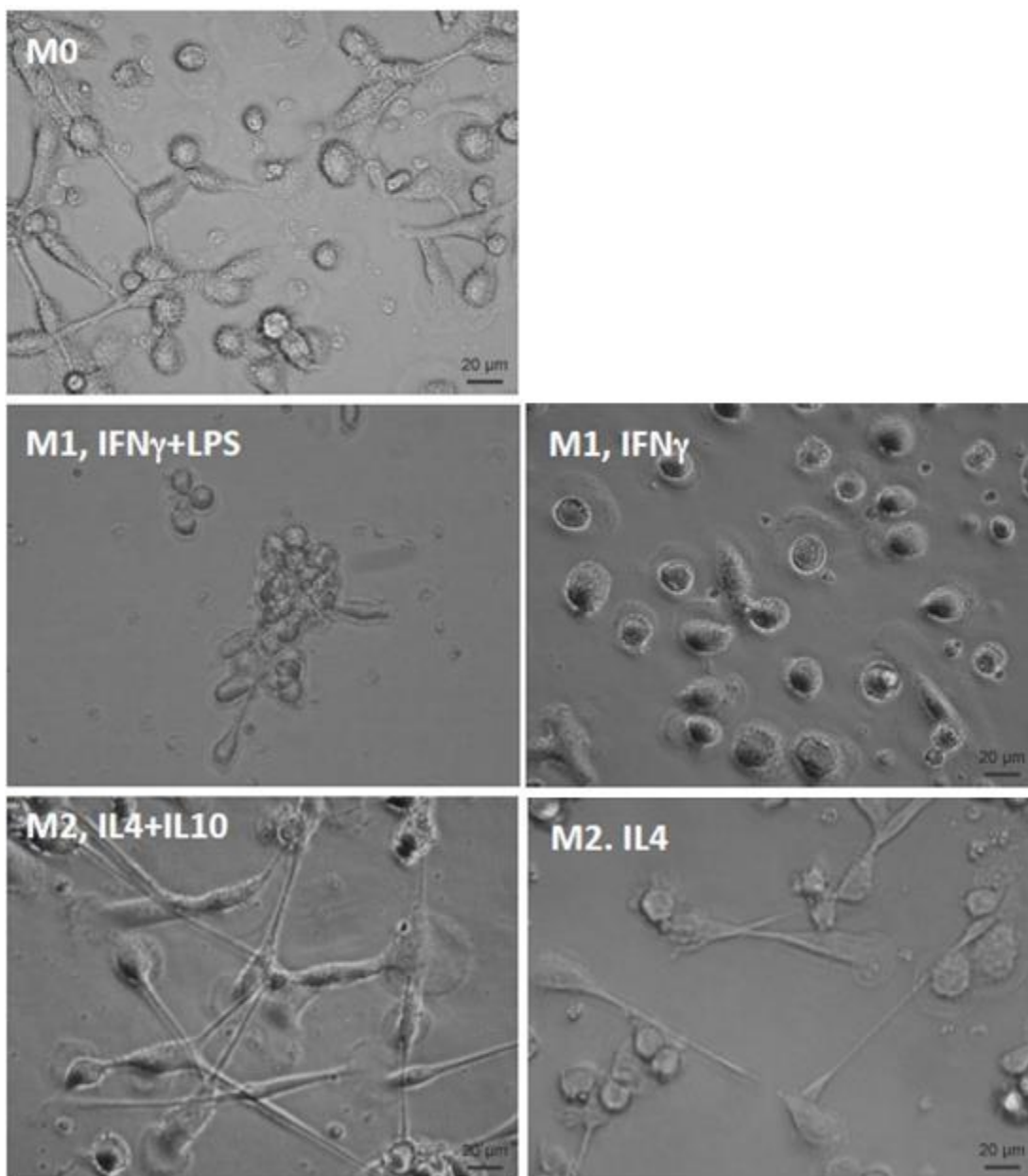


Figura 9. Morfología en los macrófagos diferenciados M1 y M2. Los macrófagos fueron diferenciados a partir de monocitos durante 7 días en presencia de 100 u/mL de $\text{IFN}\gamma$ e 100u/mL $\text{IFN-}\gamma$ + 100 u/mL LPS para los M1, 40 ng/mL de IL-4 y 40 ng/mL de IL-4 + 50 ng/mL de IL-10 para los M2, re-estimulándose con la mitad de la concentración al quinto día. Al término de la diferenciación los macrófagos fueron observados en el microscopio de contraste de fases a 40x. Representativo de 4 experimentos independientes.

A partir la cuantificación de la producción $\text{TNF-}\alpha$ y la observación de los macrófagos obtenidos en el microscopio de contraste, elegimos un solo protocolo de diferenciación para los experimentos subsecuentes; elegimos $\text{IFN-}\gamma$ para generar M1 e $\text{IL-4} + \text{IL-10}$ para generar M2 debido a que los M1 obtenidos con $\text{IFN-}\gamma$ produjeron la mayor cantidad de $\text{TNF-}\alpha$. Los M2 diferenciados con IL-4 producen cantidades mayores de $\text{TNF-}\alpha$ en comparación con los diferenciados con $\text{IL-4} + \text{IL-10}$, lo cual indica que la diferenciación no se encuentra mayoritariamente en el fenotipo M2.

Debido a que la presencia de CD14 en la membrana define claramente los tipos de macrófago (figura 10 **a**), además de cuantificar la producción de $\text{TNF-}\alpha$ en respuesta a la estimulación con LPS, para confirmar que teníamos macrófagos polarizados fue necesario cuantificar el porcentaje de células individuales vivas CD14⁺ para los M1 y células individuales vivas CD14⁻ para los M2 (figura 10 **b** y **c**). La estimulación con rapamicina o LPS no modificó el fenotipo de ninguna de las poblaciones (M1 $p=0.3020$ $n=25$; M2 $p=0.7975$, $n=18$).

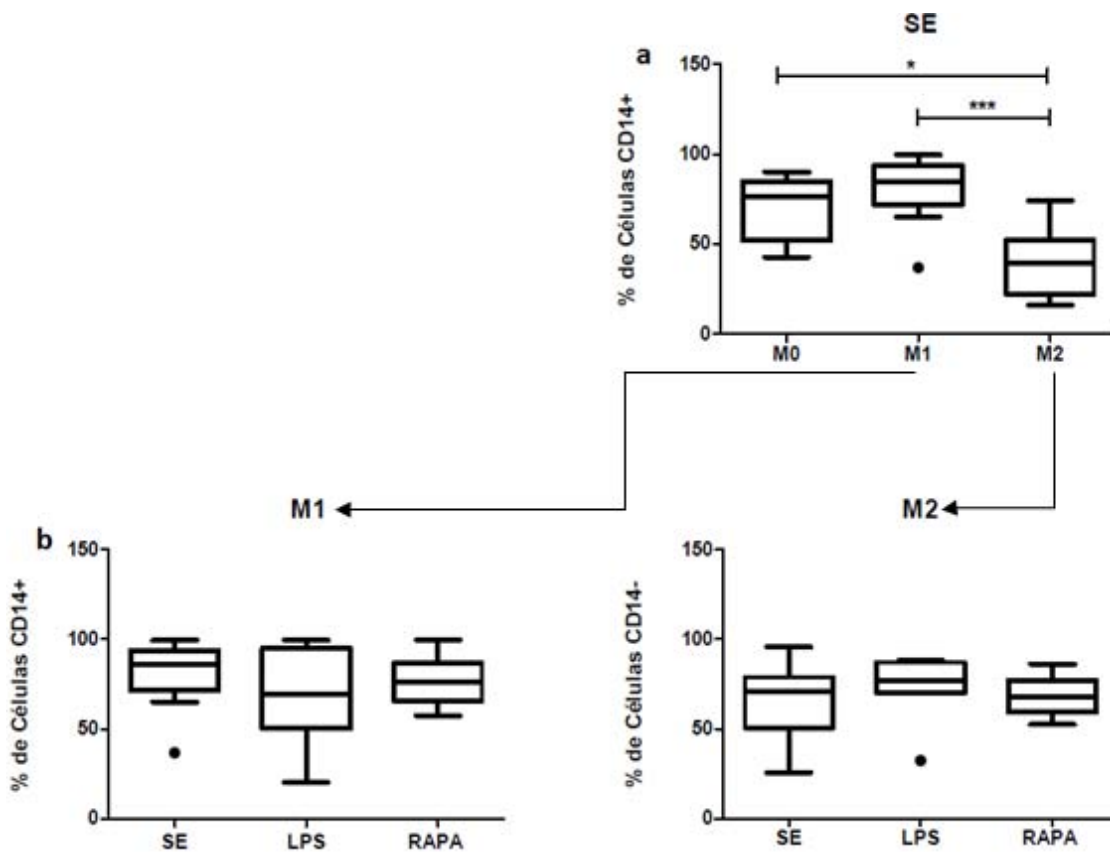


Figura 10. Evaluación del %CD14 en los macrófagos M1 y M2. Durante la diferenciación de macrófagos la expresión del receptor CD14 varía en los macrófagos M1 (aumenta) y los M2 (disminuye). Cuantificamos el porcentaje de CD14+ por citometría de flujo en macrófagos diferenciados sin estímulo (SE) en comparación a los macrófagos no activados (M0) sin estimular (**a**, $n=22$, $*p<0.01$ y $***p<0.0001$). Evaluamos en los macrófagos M1 estimulados con 500 ng/mL de rapamicina y 100 ng/ml de LPS durante 24h el porcentaje de CD14+($n=18$) de manera similar evaluamos el porcentaje de CD14- en los macrófagos M2 ($n=11$) pero no observamos diferencias significativas (**b**).

Fenotipo de los macrófagos M1 y M2

Nuestros resultados anteriores indican que el porcentaje de macrófagos CD14⁺ es mayor en la población señalada como M1 y mientras que el porcentaje de CD14⁺ disminuye en la población señalada como M2. Después investigamos el número de moléculas CD14 sobre la membrana de cada macrófago (medido como la intensidad mediana de fluorescencia) al mismo tiempo que medimos los marcadores; Dectin 1, CD36, CD62L, CD206, CD163 y CD16. Los marcadores CD16 y CD163 (datos no mostrados) no tuvieron diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de la figura 12 reflejan un aumento significativo de la expresión del receptor membranar CD14 en los M1 y una disminución marcada de este mismo en los M2, CD206 aumentan significativamente en los M2, mientras que no se modifican en los M1 (figura 11).

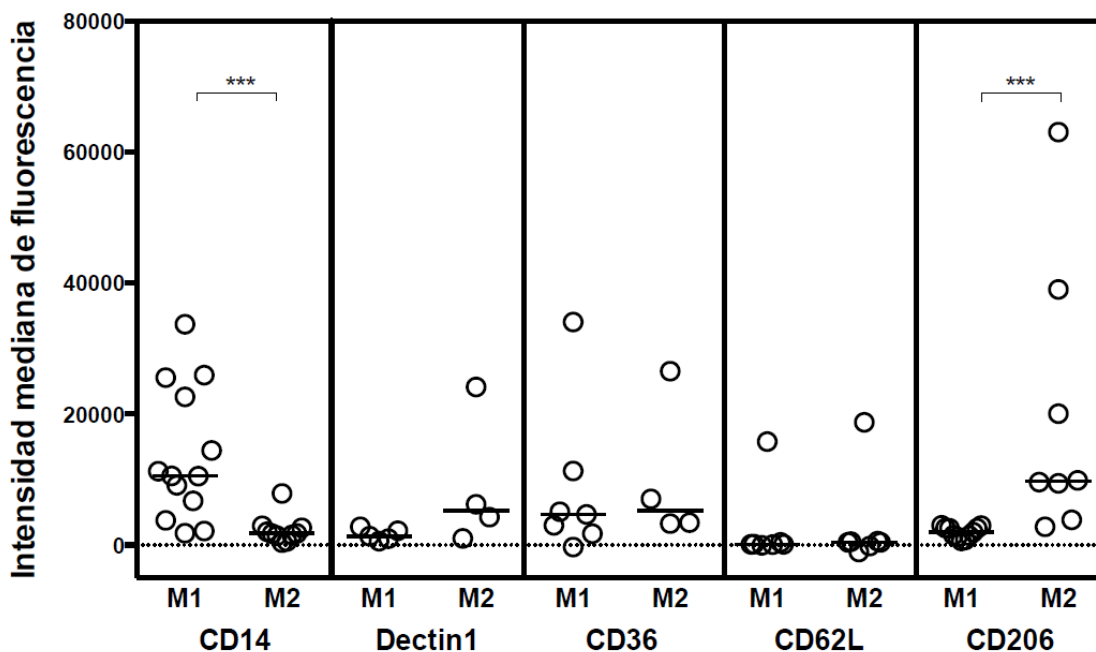


Figura 11. Evaluación del fenotipo de los macrófagos. Los macrófagos derivados de monocitos (MDM) fueron diferenciados con 100 u/mL IFN- γ para obtener M1 y 40 ng/mL de IL-4 + 50 ng/mL de IL-10 para obtener M2 durante 7 días. Se realizó tinción de membrana y se cuantificó la IMF por citometría de flujo, *** $p < 0.001$, $n = 3-6$.

Determinación de la inducción de la autofagia en los macrófagos M1 y M2

Tomando en cuenta que no todas las células de cada pozo se polarizan completamente y que la presencia o ausencia de CD14 en la membrana de los macrófagos distingue M1 de M2, la determinación de autofagia se realizó en las células CD14+ para las M1 y en las células CD14- para las M2. Debido a que los macrófagos M1 aumentan su actividad antimicrobiana como parte de su diferenciación, es la población candidata para hacer uso de la vía de autofagia como mecanismo de eliminación directo de patógenos. Para determinar la ocurrencia de este fenómeno medimos la formación de vesículas autofágicas por citometría de flujo con la sonda CyTO-ID, la cual se incorpora dentro de los autofagosomas aumentando la intensidad mediana de fluorescencia de las células comparadas con el control de células no estimuladas. Después de estimular con 500 ng/ml rapamicina y 100 ng/ml de LPS, encontramos que los macrófagos que realizan autofagia de manera significativa en respuesta al tratamiento con rapamicina fueron los macrófagos M1 (Figura 12a), mientras que los macrófagos M2 no lo hicieron (Figura 12b).

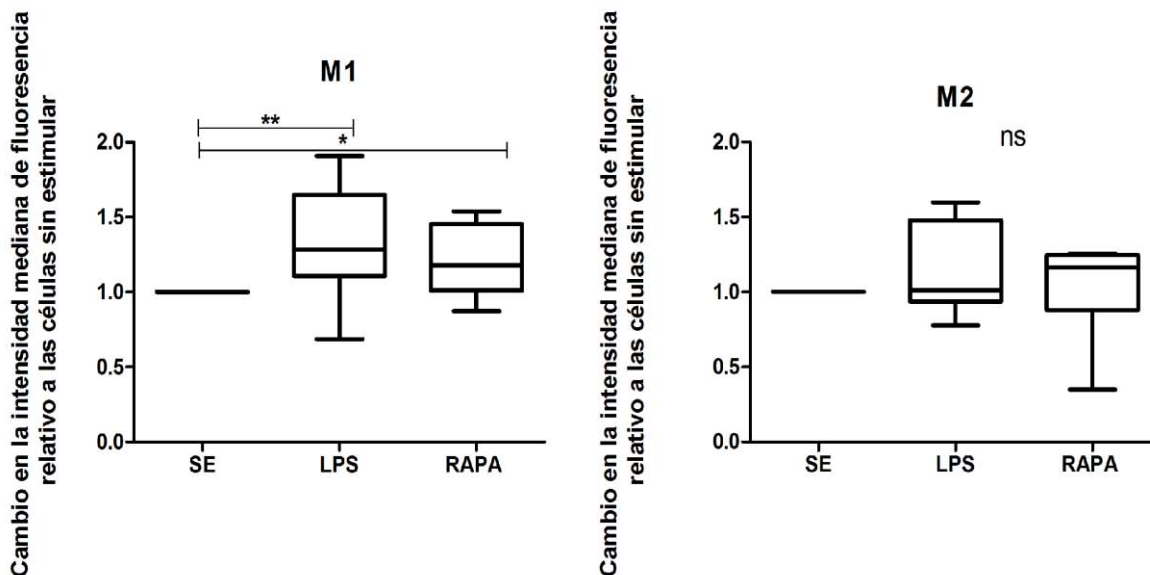


Figura 12. Cambio en la intensidad mediana de fluorescencia (autofagia) relativo a los macrófagos sin estímulo. Los macrófagos se diferenciaron con 100 u/mL IFN- γ para obtener M1 y 40 ng/mL de IL-4 + 50 ng/mL de IL-10 para obtener M2 durante 7 días. Se estimularon con LPS 500 ng/mL y rapamicina 100 ng/mL durante 24 horas; la autofagia se midió con la sonda Cyto-ID por citometría de flujo). Cuantificamos el cambio en la intensidad mediana de fluorescencia (IMF) relativo a las células sin estímulo (SE), los macrófagos M1 realizaron autofagia dependiente de la estimulación (* $p < 0.01$ y ** $p < 0.05$, $n = 13$ y a) mientras que los M2 no (ns = no significativo, $n = 8$ y b).

Determinación del fenotipo de los macrófagos estimulados con rapamicina

Con la idea en mente de que la autofagia podría modificar el fenotipo del macrófago, y observando que durante la diferenciación de los macrófagos M1 se aumenta de manera significativa la presencia del receptor CD14, mientras que disminuye drásticamente en los M2, partimos de este marcador para realizar el análisis de fenotipo de las células que realizan autofagia por estimulación con rapamicina tanto de manera temprana (24h) como tardía (48h). Los marcadores empleados para el análisis fueron CD14, CD16, y CD62L, nosotros consideramos el fenotipo M1 como CD14+CD16-CD62L- (figura 13 **a**, $n=7$), mientras que el fenotipo M2 fue CD14-CD16-CD62L+ (figura 13 **b**, $n=3$). En ambas poblaciones no observamos cambios en el fenotipo dependientes de la estimulación con rapamicina ni LPS.

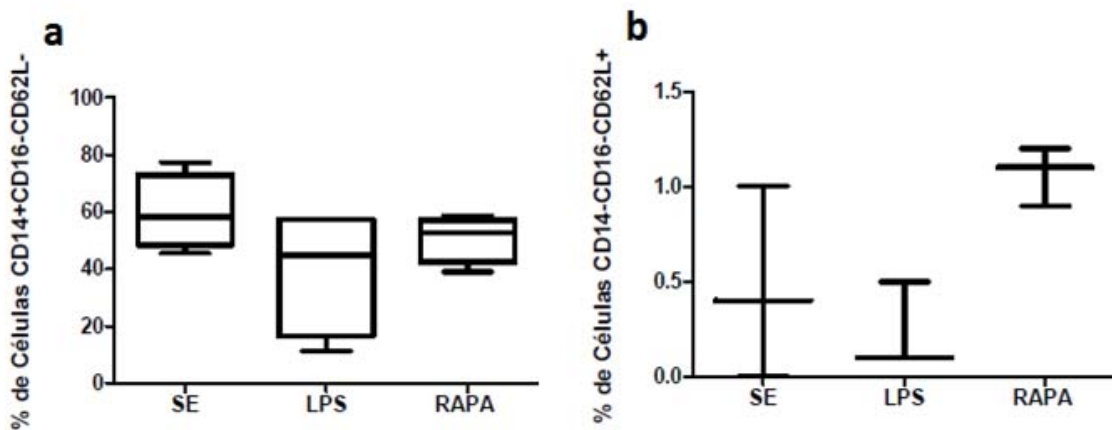


Figura 13. Determinación del fenotipo de los macrófagos. Los macrófagos fueron diferenciados con 100 u/mL IFN- γ para obtener M1 y 40 ng/mL de IL-4 + 50 ng/mL de IL-10 para obtener M2 durante 7 días. Se estimularon con LPS 500 ng/mL y rapamicina 100 ng/mL durante 24 horas. Las gráficas muestran macrófagos M1 (**a**, n=7) y M2 (**b**, n= 3) evaluados por citometría de flujo teñidos con los marcadores CD14, CD16 y CD 62L.

En el segundo panel de tinción la estrategia de análisis utilizada para el fenotipo M1 fue CD14+CD36-CD16-CD206- (figura 14 **a**), mientras que para el fenotipo M2 fue CD14-CD36+CD16-CD206+ (figura 14 **b**). No se observaron cambios significativos en el fenotipo dependiente de la estimulación con rapamicina y LPS.

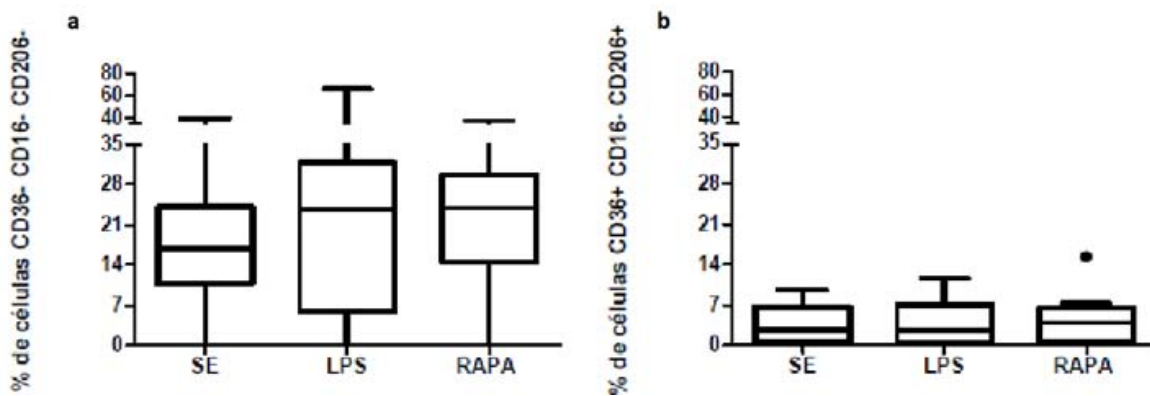


Figura 14. Análisis de fenotipo de las células obtenidas con el segundo panel de marcadores. En el segundo análisis de fenotipo empleado utilizamos los marcadores CD14, CD36, CD16 y CD206, el fenotipo M1 fue considerado como CD14+CD36- CD16-CD206- (**a**, n=4) mientras que para los M2 fue CD14-CD36+CD16-CD206+ (**b**, n=3).

Al no observar modificaciones en el fenotipo de los macrófagos estimulados de manera temprana (24h), decidimos ampliar el tiempo, analizando el fenotipo de manera tardía (48h). Cuantificamos la producción de $TNF\alpha$ en los macrófagos M1 y M2 estimulados durante 48 horas pero no observamos diferencia significativamente estadística (M1 mediana 56.42, rango 53.9-282.7 pg/mL; M2 mediana 88.11, rango 24.08-599.8 pg/Ml n= 3, datos no mostrados)

Para observar la autofagia cuantificamos el cambio en la intensidad mediana de fluorescencia relativo a las células sin estimular en macrófagos M1 (figura 16 **a**) y macrófagos M2 (figura 15 **b**), pero no observamos cambio en el IMF en comparación con las células sin estímulo.

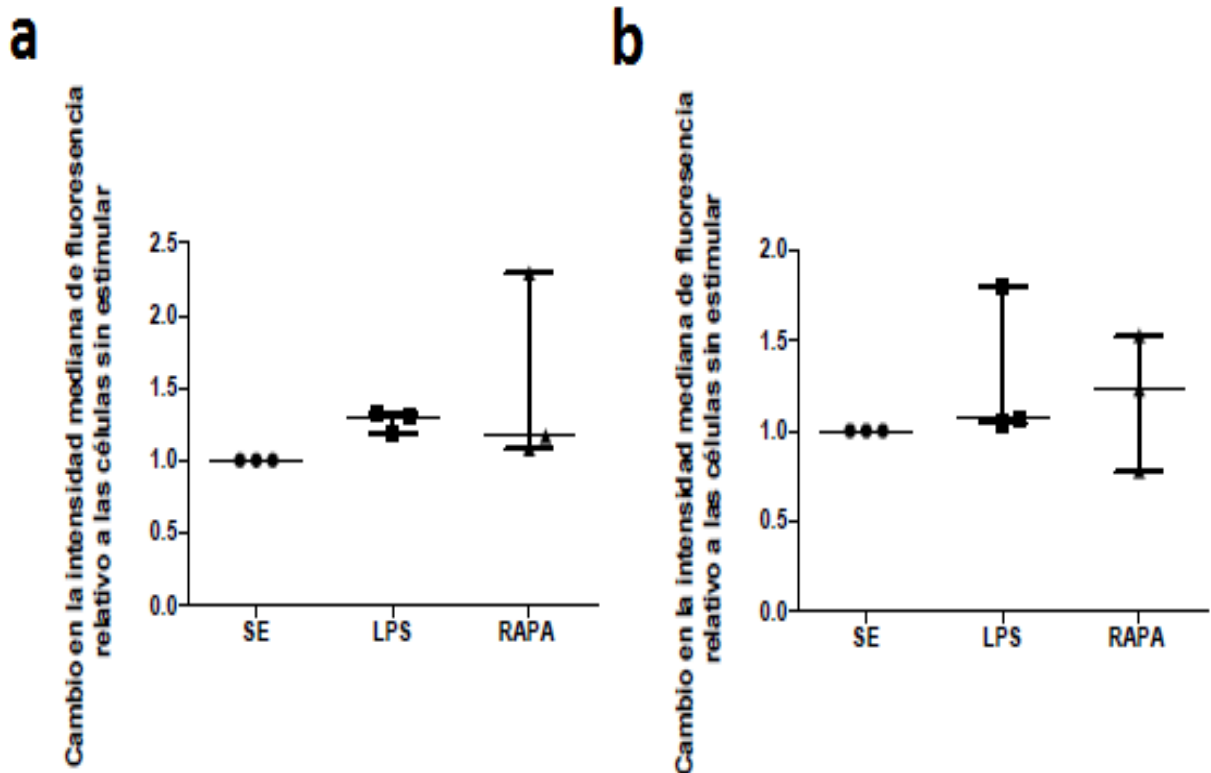


Figura 15. Cambio en la intensidad mediana de fluorescencia (autofagia) en macrófagos estimulados durante 48 horas. Los macrófagos M1 y M2 fueron estimulados con LPS y rapamicina durante 48 horas, se realizó la tinción con la sonda Cyto-ID y se cuantificó la autofagia por citometría de flujo. Los macrófagos M1 (a) y M2 (b) estimulados no obtuvieron diferencias significativas con respecto a las células sin estímulo, es decir no realizan autofagia dependiente a la estimulación.

Después analizamos el fenotipo de los macrófagos M1 y M2 al término de la estimulación tardía (48h) con LPS y rapamicina. Observamos en los macrófagos M1 la expresión de CD14 se mantiene independiente de la estimulación (Figura 16 a). En los macrófagos M2 notamos un aumento en los niveles de expresión de CD14 en comparación a la estimulación temprana. (Figura 16 b)

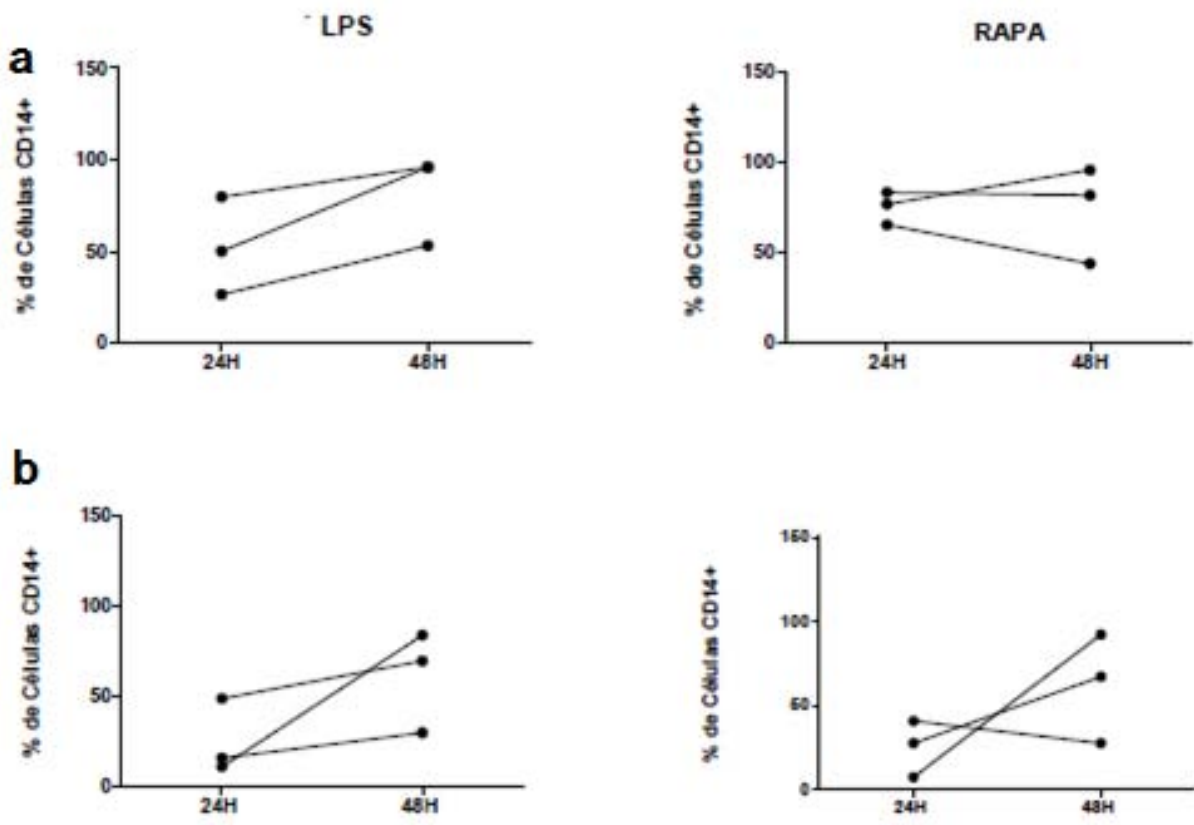


Figura 16. Evaluación del porcentaje de CD14 en macrófagos estimulados durante 48 horas. Los macrófagos M1 y M2 fueron estimulados con LPS y rapamicina durante 48 horas, evaluamos el porcentaje de CD14 en los M1 (a) estimulados con LPS y rapamicina y comparamos la producción registrada a las 24 horas, de igual manera analizamos el porcentaje de CD14 en los M2 (b), observando una tendencia de aumento en comparación a la producción registrada a las 24 horas de estimulación. No observamos diferencia estadísticamente significativa.

Discusión

Los macrófagos poseen una amplia plasticidad que permite al macrófago diferenciado revertir su fenotipo además de regresar a las condiciones iniciales de macrófago activado (MO) (Mosser and Edwards 2008). Nosotros decidimos investigar el fenotipo de los macrófagos humanos activados (autofagia) con rapamicina debido a que la re-polarización dentro de contexto de infecciones se propone como nueva estrategia de terapia (Deretic 2012). Recientemente se ha documentado la estimulación durante la diferenciación de los macrófagos con rapamicina modifica el fenotipo de los M1 pero no de los M2 (Mills et al. 2000). La rapamicina es un fármaco de origen fúngico que es utilizado como inmunosupresor en trasplantes de órganos, inmunoterapias en el tratamiento de enfermedades como alzhéimer, Huntington, Parkinson, diabetes, VIH y trombosis coronaria.(Fielhaber et al. 2012; M. Fabri 2011; Cassol et al. 2010; Lawrence and Natoli 2011)

La inducción de la autofagia como terapia alternativa contra patógenos intracelulares ha generado interés al ser empleada como blanco terapéutico y su regulación en el proceso de inflamación mediada por macrófagos. Son los macrófagos las células que han recibido la mayor atención debido a su papel dentro los tratamientos contra enfermedades proteíno-degenerativas en modelos de rata y ratón, pero aún no se cuenta con información en macrófagos humanos. Dentro del estudio de la autofagia se ha demostrado que la supresión del complejo de mTOR, el cual activa la vía de la autofagia, es crucial para la supervivencia y activación del fenotipo pro-inflamatorio de macrófagos en modelos (Danner et al. 2008). En el presente trabajo se investigó el papel de la autofagia activada por rapamicina en la polarización de macrófagos humanos.

Primero obtuvimos macrófagos diferenciados en M1 y M2, los M1 se encuentran orientados hacia una función pro-inflamatoria y altamente fagocítica, participando dentro de la inmunidad innata, mientras que los M2 tienen funciones anti-inflamatorias y de reparación de tejidos participando durante la resolución de la inflamación (Martinez and Gordon 2014; Martinez et al. 2014). Para obtener macrófagos M1 y M2 fue necesario

diseñar un protocolo de diferenciación que nos permitiera observar a ambas poblaciones, utilizamos dos estrategias de diferenciación con la finalidad de obtener la mayor cantidad de macrófagos de cada tipo. Para obtener M1 utilizamos IFN- γ + LPS o IFN- γ solo (Q., Liu and R. 2011; Martinez et al. 2014; Davis, Tsang, and Qiu 2013; Mercalli et al. 2013; Raes et al. 2002). Los artículos revisados para dar referencia al presente trabajo hacen alusión al uso de LPS combinado con IFN- γ para obtención de los M1, pero en este trabajo se determinó que la estimulación combinada (LPS + IFN- γ) tiene menor producción de TNF- α en comparación con los macrófagos estimulados solo IFN- γ . TNF- α es una citocina característica del perfil pro-inflamatorio de los M1, su producción en los M2 disminuye drásticamente. (Bogdans, Vodovotz, and Nathan 1992; Stout and Suttles 2004). Además de la producción de citocinas, la expresión diferencial de receptores es importante durante el análisis de fenotipo de ambas poblaciones, el receptor que más nos llamó la atención fue CD14; el cual tiene diferencias significativas entre los M1 (aumenta) y M2 (disminuye), es por eso que decidimos analizar el porcentaje de macrófagos CD14+ en los M1 y su ausencia en los M2.

Posteriormente se procedió a determinar la inducción de la autofagia en los macrófagos M1 y M2. Los macrófagos M1 como parte de su diferenciación aumentan la actividad microbicida y producción de citocinas inflamatorias, es por ello que son la población que utiliza a la autofagia como mecanismo de la respuesta inmune hacia patógenos, mientras que los macrófagos M2 producen citocinas anti-inflamatorias y secretan colágeno, su actividad se orienta hacia la reparación tisular y angiogénesis (D. Mosser and Edwards 2008). Para observar la autofagia se evaluó la intensidad mediana de fluorescencia de los macrófagos estimulados con rapamicina y LPS. Los macrófagos poseen receptores en su superficie que les permite detectar componentes microbianos (Charo 2007); en el caso del LPS, el cual es un componente de la pared microbiana es reconocido por TLR4, mientras que rapamicina es un fármaco que inhibe el complejo mTOR activando la autofagia, ambos compuestos estimulan la activación de la autofagia, pero por diferentes vías. No se encontraron diferencias entre la estimulación con rapamicina o LPS en los M1, no obstante los M1 tienen mayor producción de vesículas autofágicas en comparación a los M2; esto se debe a que los M1 están especializados en el reconocimiento de patógenos durante la inmunidad innata, dicho aumento de autofagia en

los M1 tiene un efecto positivo en la eliminación de patógenos intracelulares y toxinas y presentación de antígenos vía MHC II, ayudando en la resolución de la infección. Mientras que los M2 no generan autofagia dependiente de la estimulación, lo cual confirma que son los M1, la población que realiza autofagia como mecanismo de defensa.

La autofagia es el principal mecanismo de defensa y eliminación de patógenos, pero también es la principal vía de replicación de patógenos, los cuales utilizan a los autofagosomas como nichos de replicación (Shahnazari and Brumell 2011; Biswas et al. 2008). La autofagia es un proceso de corta duración, evitando así la acumulación de autofagosomas, favoreciendo la degradación de patógenos, toxinas, presentación de antígenos vía MHC II, además de prevenir excesiva inflamación provocada por una variedad de enfermedades inflamatorias, pero la desregulación de la autofagia puede contribuir a la predisposición a enfermedades como la enfermedad de Crohn (Jo, Shin, and Choi 2012). Conociendo que son los M1 las células que realizan autofagia, investigamos si fenotipo de los macrófagos M1 y M2 era modificado por la activación de la autofagia con rapamicina. Como parte de su diferenciación los macrófagos M1 y M2 adquieren propiedades diferentes que definen ambos fenotipos; por ejemplo los M1 tienen un perfil pro-inflamatorio, aumentan la expresión de genes de diferentes receptores como; M-CSF, CD11b, CD18, CD14, además de aumentar su capacidad fagocítica de patógenos. Los M2 aumentan receptores scavenger CD209, CD163, glucocorticoides, fibronectina (Sierra, Filardi 2010; Piedras Claudio 2010) Considerando las características pro y anti inflamatorias de nuestras poblaciones, encontramos que no se modificó el fenotipo de ambas poblaciones de macrófagos debido a la estimulación con rapamicina de manera temprana.

Después evaluamos el fenotipo de ambas poblaciones de macrófagos a las 48 horas post-estimulación, pero no observamos diferencias estadísticamente significativas por efecto de la estimulación con rapamicina, lo que sugiere que la autofagia ha terminado. En seguida analizamos los niveles de expresión de los receptores y fenotipo de los macrófagos post-estimulados, pero observamos un incremento en el porcentaje de expresión de macrófagos CD14+ en los M2, que no fue estadísticamente significativo, probablemente no obtuvimos diferencia debido al tamaño de la muestra (n=3).

Conclusiones

- ∇ Los macrófagos M1 y M2 producen TNF- α y aunque la producción de los M2 es menor.
- ∇ Los M1 conservan la morfología de los M0 redondeada, mientras los M2 adquieren una morfología de aguja.
- ∇ Los niveles de expresión de CD14 aumenta en los M1 y disminuye en los M2, mientras que la expresión de CD62L y CD209 aumenta en los M2.
- ∇ Los macrófagos M1 realizan autofagia dependiente de la estimulación con rapamicina y LPS.
- ∇ El fenotipo de los macrófagos M1 y M2 no se modifica dependiente a la estimulación temprana (24h) con rapamicina y LPS.
- ∇ La autofagia no es detectable a las 48 horas post-estimulación con rapamicina y LPS en los macrófagos M1 y M2.

Bibliografía

- Abbas, A., and Lichtman, A. 2006. *Inmunología Celular Y Molecular*. quinta. Elsevier.
- Albrecht, Valerie. 2006. “Molekulare Mechanismen Der Lipopolysaccharid-Toleranz in Dendritischen Zellen”. TU München.
- Biswas, Debasis, Omar S Qureshi, Wing-Yiu Lee, Joanne E Croudace, Manuela Mura, and David a Lammas. 2008. “ATP-Induced Autophagy Is Associated with Rapid Killing of Intracellular Mycobacteria within Human Monocytes/macrophages.” *BMC Immunology* 9 (January): 35. doi:10.1186/1471-2172-9-35.
- Bogdans, Christian, Yoram Vodovotz, and Carl Nathan. 1992. “Contrasting Mechanisms for Suppression of Macrophage Cytokine Release by Transforming Growth Factor- B and Interleukin-.” *The Journal of Biological Chemistry*.
- Cassetta, Luca, Edana Cassol, and Guido Poli. 2011. “Macrophage Polarization in Health and Disease.” *TheScientificWorldJournal* 11 (January): 2391–2402. doi:10.1100/2011/213962.
- Cassol, Edana, Luca Cassetta, Massimo Alfano, and Guido Poli. 2010. “Macrophage Polarization and HIV-1 Infection.” *Journal of Leukocyte Biology* 87 (4): 599–608. doi:10.1189/jlb.1009673.
- Charo, Israel F. 2007. “Macrophage Polarization and Insulin Resistance: PPARgamma in Control.” *Cell Metabolism* 6 (2): 96–98. doi:10.1016/j.cmet.2007.07.006.
- Congcong He and Daniel J. Klionsky. 2010. “Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy.” *Annual Review Genetic*, no. 68: 67–93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910.Regulation.
- Danner, S, S Sigrist, F Moreau, K Mandes, C Vodouhé, a Langlois, S Soskin, M Fichbach, M Pinget, and L Kessler. 2008. “Influence of Rapamycin on Rat Macrophage Viability and Chemotaxis toward Allogenic Pancreatic Islet Supernates.” *Transplantation Proceedings* 40 (2): 470–72. doi:10.1016/j.transproceed.2008.01.002.
- Davis, Michael J, Tiffany M Tsang, and Yafeng Qiu. 2013. “Macrophage M1/M2 Polarization Dynamically Adapts to Changes in Cytokine Microenvironments in Cryptococcus Neoformans Infection.” *Journal American Mathematical Society*. doi:10.1128/mBio.00264-13.Editor.
- Delgado, Mónica a, Rasha a Elmaoued, Alexander S Davis, George Kyei, and Vojo Deretic. 2008. “Toll-like Receptors Control Autophagy.” *The EMBO Journal* 27 (7): 1110–21. doi:10.1038/emboj.2008.31.

- DeLisa Fairweather, and Daniela Cihakova. 2009. "Alternatively Activated Macrophages in Infection and Autoimmunity." *J. Autoimmun* 33: 222–30. doi:10.1016/j.jaut.2009.09.012.Alternatively.
- Deretic, Vojo. 2012. "Autophagy as an Innate Immunity Paradigm: Expanding the Scope and Repertoire of Pattern Recognition Receptors." *Current Opinion in Immunology* 24 (1): 21–31. doi:10.1016/j.coi.2011.10.006.
- Dorn, Brian R, and William A Dunn. 2001. "Porphyromonas Gingivalis Traffics to Autophagosomes in Human Coronary Artery Endothelial Cells." *Infection and Immunity* 69 (9): 5698–5708. doi:10.1128/IAI.69.9.5698.
- Edwards, Justin P, Xia Zhang, And Frauwirth, Kenneth A, and David M Mosser. 2009. "Biochemical and Functional Characterization of Three Activated Macrophage Populations." *Journal of Leukocyte Biology* 80 (6): 1298–1307. doi:10.1189/jlb.0406249.Biochemical.
- Fabri, M. 2011. "Vitamina D Required for IFN- γ Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages." *Science*.
- Fabri, Mario, Susan E Realegeno, Eun-Kyeong Jo, and Robert L Modlin. 2011. "Role of Autophagy in the Host Response to Microbial Infection and Potential for Therapy." *Current Opinion in Immunology* 23 (1). Elsevier Ltd: 65–70. doi:10.1016/j.coi.2010.10.010.
- Fielhaber, Jill a, Scott F Carroll, Anders B Dydensborg, Mitra Shourian, Alexandra Triantafillopoulos, Sharon Harel, Sabah N Hussain, Maxime Bouchard, Salman T Qureshi, and Arnold S Kristof. 2012. "Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Augments Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury and Apoptosis." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 188 (9): 4535–42. doi:10.4049/jimmunol.1003655.
- Gutierrez, Maximiliano G, Sharon S Master, Sudha B Singh, Gregory A Taylor, Maria I Colombo, and Vojo Deretic. 2004. "Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium Tuberculosis Survival in Infected Macrophages." *Cell* 119 (6): 753–66. doi:10.1016/j.cell.2004.11.038.
- Hansen, Tom Egil, and Terje Johansen. 2011. "Following Autophagy Step by Step." *BMC Biology* 9 (January): 39. doi:10.1186/1741-7007-9-39.
- Jo, Eun-Kyeong, Dong-Min Shin, and Augustine M K Choi. 2012. "Autophagy: Cellular Defense to Excessive Inflammation." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 14 (2). Elsevier Masson SAS: 119–25. doi:10.1016/j.micinf.2011.08.014.
- Juárez, Esmeralda, Claudia Carranza, Fernando Hernández-Sánchez, Juan C León-Contreras, Rogelio Hernández-Pando, Dante Escobedo, Martha Torres, and Eduardo

- Sada. 2012. "NOD2 Enhances the Innate Response of Alveolar Macrophages to Mycobacterium Tuberculosis in Humans." *European Journal of Immunology* 42 (4): 880–89. doi:10.1002/eji.201142105.
- Kawanishi, Noriaki, Hiromi Yano, Yuka Yokogawa, and Katsuhiko Suzuki. 2010. "Exercise Training Inhibits Inflammation in Adipose Tissue via Both Suppression of Macrophage Infiltration and Acceleration of Phenotypic Switching from M1 to M2 Macrophages in High-Fat-Diet-Induced Obese Mice." *Exercise Immunology Review* 16 (January): 105–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839495>.
- Khanna, Raj. 2011. *Immunology*. 1st ed. Oxford Higher Education.
- Klionsky, Daniel J. 2012. "Look People , ‘ Atg ’ Is an Abbreviation for ‘ Autophagy-Related .’ That ’ S It .” *Autophagy* 22 (September): 1281–82.
- Labonte, Adam C, and Young S Hahn. 2014. "The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases." *Molecules and Cells* 37 (4): 275–85.
- Laskin, Debra L, Barry Weinberger, and Jeffrey D Laskin. 2001. "Functional Heterogeneity in Liver and Lung Macrophages." *Journal of Leukocyte Biology* 70 (August): 163–70.
- Lawrence, Toby, and Gioacchino Natoli. 2011. "Transcriptional Regulation of Macrophage Polarization : Enabling Diversity with Identity." *Nature Reviews Immunology* 11 (11). Nature Publishing Group: 750–61. doi:10.1038/nri3088.
- Li-Ying, D., Shen, A., Wilkinson, W., Patton, N., Lai, E., Chan, D., Kuksin, B., J., and Qiu. 2012. "A Novel Image-Based Cytometry Method for Autophagy Detection in Living Cells 1." *Landes Bioscience*, no. September: 1371–82.
- Mantovani, Alberto, Antonio Sica, and Massimo Locati. 2005. "Macrophage Polarization Comes of Age." *Immunity* 23 (4): 344–46. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.001.
- Manual, Instruction. 2011. "Cyto-ID ® Autophagy Detection Kit", no. December.
- Martinez, Fernando O, and Siamon Gordon. 2014. "The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment." *F100 Prime Reports* 6 (March): 13. doi:10.12703/P6-13.
- Martinez, Fernando O, Siamon Gordon, Massimo Locati, and Alberto Mantovani. 2014. "Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression." *The Journal of Immunology*.
- Mercalli, Alessia, Ines Calavita, Erica Dugnani, Antonio Citro, Elisa Cantarelli, Rita Nano, Raffaella Melzi, et al. 2013. "Rapamycin Unbalances the Polarization of Human Macrophages to M1." *Immunology* 140 (2): 179–90. doi:10.1111/imm.12126.

- Mills, C D, K Kincaid, J M Alt, M J Heilman, and a M Hill. 2000. "M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164 (12): 6166–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843666>.
- Mizushima, Noboru. 2007. "Autophagy: Process and Function." *Genes & Development* 21 (22): 2861–73. doi:10.1101/gad.1599207.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine, B. 2010. "Methods in Mammalian Autophagy Research." *Cell* 140 (3): 313–26. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028.Methods.
- Mosser, David, and Justin Edwards. 2008. "Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation." *Nature Reviews. Immunology* 8 (12). Nature Publishing Group: 958–69. doi:10.1038/nri2448.
- Mosser, David M, and Justin P Edwards. 2008. "Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation." *Nature Reviews. Immunology* 8 (12). Nature Publishing Group: 958–69. doi:10.1038/nri2448.
- Mostowy, Serge, and Pascale Cossart. 2012. "Bacterial Autophagy: Restriction or Promotion of Bacterial Replication?" *Trends in Cell Biology* 22 (6). Elsevier Ltd: 283–91. doi:10.1016/j.tcb.2012.03.006.
- Nakagawa, I., Et al. 2004. "Autophagy Defends Cells against Invading Group A Streptococcus." *Science*. doi:10.1126/science.1103966.
- O. Amer and Swanson, A. M. 2006. "Autophagy Is an Immediate Macrophage Response to Legionella Pneumophil." *Cell Microbiology* 7 (6): 765–78.
- Ogura, Y, N Inohara, a Benito, F F Chen, S Yamaoka, and G Nunez. 2001. "Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF-kappaB." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (7): 4812–18. doi:10.1074/jbc.M008072200.
- Passlick, B, D Flieger, and H W Ziegler. 2014. "Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in." *Blood*, 2527–34.
- Piedras Claudio, Fabiola. 2010. "Comunicación Mitocondrial-Núcleo En La Síntesis de Citocinas En Macrófagos J774 Estimulados Con Un Ligando Para TLR4". México, D.F: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
- Q., Liu and R., Hamblin. 2011. "MACROPHAGE-TARGETED PHOTODYNAMIC THERAPY: SCAVENGER RECEPTOR EXPRESSION AND ACTIVATION STATE." *Inmunopatholgy Pharmacology* 18 (3): 391–402.
- Raes, Geert, Patrick De Baetselier, Wim Noe, Alain Beschin, and Frank Brombacher. 2002. "Differential Expression of FIZZ1 and Ym1 in Alternatively versus Classically

Activated Macrophages Abstract: Alternatively Activated Macrophages.” *Journal of Leukocyte Biology* 71 (April): 597–602.

Shahnazari, Shahab, and John H Brumell. 2011. “Mechanisms and Consequences of Bacterial Targeting by the Autophagy Pathway.” *Current Opinion in Microbiology* 14 (1). Elsevier Ltd: 68–75. doi:10.1016/j.mib.2010.11.001.

Sica, Antonio, and Alberto Mantovani. 2012. “Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas.” *Science in Medicine* 122 (3): 787–95. doi:10.1172/JCI59643DS1.

Sierra, Filardi, Elena. 2010. “Marcadores de Activación Alternativa de Macrófagos: DC-SIGN Y FR β Marcadores de Activación Alternativa de Macrófagos: DC-SIGN Y FR β ”. Universidad Complutense de Madrid.

Sindrilaru, Anca, Thorsten Peters, Stefan Wieschalka, Corina Baican, Adrian Baican, Henriette Peter, Adelheid Hainzl, et al. 2011. “An Unrestrained Proinflammatory M1 Macrophage Population Induced by Iron Impairs Wound Healing in Humans and Mice.” *The Journal of Clinical Investigation* 121 (3): 985–97. doi:10.1172/JCI44490DS1.

Stout, Robert D, and Jill Suttles. 2004. “Functional Plasticity of Macrophages: Reversible Adaptation to Changing Microenvironments.” *Journal of Leukocyte Biology* 76 (September): 509–13. doi:10.1189/jlb.0504272.Journal.

Sumpter, Rhea, and Beth Levine. 2010. “Autophagy and Innate Immunity: Triggering, Targeting and Tuning.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (7). Elsevier Ltd: 699–711. doi:10.1016/j.semcdb.2010.04.003.

Thomson, AW, HR Turnquist, and G Raimondi. 2009. “Immunoregulatory Functions of mTOR Inhibition.” *Nature Reviews* ... 9 (5): 324–37. doi:10.1038/nri2546.Immunoregulatory.

Toribio, Luis Arpa. 2008. “Mecanismos Moleculares Que Regulan La Activación Clásica Y Alternativa En Los Macrófagos”. Universidad de Barcelona.

Weichhart, Thomas, Giuseppina Costantino, Marko Poglitsch, Margit Rosner, Maximilian Zeyda, Karl M Stuhlmeier, Thomas Kolbe, et al. 2008. “The TSC-mTOR Signaling Pathway Regulates the Innate Inflammatory Response.” *Immunity* 29 (4): 565–77. doi:10.1016/j.immuni.2008.08.012.