



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y CAPACIDAD
FAGOCÍTICA DE LA AMINOPEPTIDASA N (CD13) EN
MACRÓFAGOS HUMANOS CON DISTINTOS ESTADOS DE
ACTIVACIÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ENRIQUE OLGUÍN MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **RODOLFO PASTELÍN PALACIOS**

VOCAL: **Profesor:** **MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO**

SECRETARIO: **Profesor:** **ANA DIANA RIVERA FUENTES**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **JULIO CESAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**

2° SUPLENTE: **Profesor:** **ENRIQUE ORTEGA SOTO**

ESTE TRABAJO FUÉ DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DEL CUAL ES TITULAR EL DOCTOR ENRIQUE ORTEGA SOTO PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. ANA DIANA RIVERA FUENTES

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

SUSTENTANTE:

ENRIQUE OLGUÍN MARTÍNEZ

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, con el apoyo económico de CONACYT (Proyecto 178803) y de PAPIIT, DGAPA, UNAM (Proyecto IN210314) del cual recibí una beca.

Agradezco también a la M. en IBB. Claudia A. Garay Canales por su apoyo técnico a lo largo del desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	8
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Origen y diferenciación de macrófagos	9
2.2 Polarización de macrófagos	11
2.3 Clasificación	11
2.3.1 Macrófagos inflamatorios (activados clásicamente)	13
2.3.2 Macrófagos reparadores de tejido	15
2.3.3 Macrófagos reguladores	17
2.4 Modulación de marcadores en macrófagos polarizados y CD13	19
2.5 Aminopeptidasa N (CD13/APN)	21
2.5.1 Estructura de CD13	22
2.5.2 Actividad enzimática	23
2.5.3 Endocitosis	24
2.5.4 Transducción de señales	24
2.5.5 Fagocitosis	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVO GENERAL	29
5.1 Objetivos particulares	29
6. METODOLOGÍA	30
6.1 Generación de subpoblaciones de macrófagos	30
6.1.1 Diferenciación de células THP-1 a células tipo macrófagos	30

6.1.2	Polarización de macrófagos con distintos estímulos de activación	31
6.2	Citometría de flujo	32
6.2.1	Inmunofluorescencia directa	32
6.2.2	Inmunofluorescencia indirecta	33
6.3	Biología molecular	33
6.3.1	Diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real	33
6.3.2	Extracción de RNA	34
6.3.3	Tratamiento con DNAsa	36
6.3.4	Reacción de retrotranscripción (síntesis de cDNA)	37
6.3.5	PCR en tiempo real	37
6.4	Fagocitosis selectiva a través de CD13	38
6.4.1	Tinción de eritrocitos con CFSE	38
6.4.2	Marcaje de eritrocitos con fragmentos F(ab) ₂ cabra anti-inmunoglobulinas (Ig) de ratón	39
6.4.3	Ensayos de fagocitosis	40
6.5	Análisis estadístico	41
7.	RESULTADOS	41
7.1	Diferenciación celular de monocitos a células tipo macrófagos	41
7.2	Polarización de células tipo macrófagos a los diferentes fenotipos (inflamatorios, reguladores y reparadores de tejido)	44
7.3	Expresión de CD13 en la membrana celular de macrófagos con distintos estados de polarización	47
7.4	Expresión del RNA mensajero de CD13 en macrófagos polarizados	50
7.5	Capacidad fagocítica de CD13 en macrófagos polarizados	53

8. DISCUSIÓN	60
8.1 Diferenciación y polarización	61
8.2 Expresión de CD13 en macrófagos polarizados	69
8.3 Fagocitosis a través de CD13 en macrófagos polarizados	74
9. CONCLUSIONES	82
10.FIGURAS COMPLEMENTARIAS	83
11.BIBLIOGRAFÍA	88

1. RESUMEN

Los macrófagos son una población celular cuyo fenotipo es alterado por el microambiente circundante; lo que les permite realizar con mayor eficiencia funciones específicas. Con base en esto se han propuesto 3 tipos básicos de estados de polarización de macrófagos: inflamatorios, reguladores y reparadores de tejido. La descripción de moléculas que sean expresadas diferencialmente en las distintas subpoblaciones de macrófagos ha cobrado gran importancia para comprender su participación en la defensa del organismo y en la homeostasis de los tejidos.

Entre las moléculas expresadas en células mieloides, las aminopeptidasas juegan un papel crucial en la funcionalidad de las células debido a su participación en la regulación, activación y maduración de distintas proteínas efectoras. La aminopeptidasa N (CD13) ha sido asociada con procesos como adhesión celular y fagocitosis entre otros, que podrían contribuir en las distintas subpoblaciones de macrófagos polarizados. El objetivo de este trabajo, es determinar la modulación de la expresión y capacidad fagocítica de CD13 en los distintos estados de polarización de los macrófagos.

Nosotros encontramos que los 3 estados de polarización básicos incrementan la expresión del RNA mensajero de CD13, pero solo los macrófagos reguladores y reparadores incrementan la expresión en membrana de esta molécula. A pesar de estos resultados, la fagocitosis mediada por CD13 parece ser independiente de su expresión en las distintas subpoblaciones de macrófagos, ya que la capacidad fagocítica únicamente se incrementa en los macrófagos reguladores mientras que disminuye en los macrófagos inflamatorios y reparadores de tejido.

2. MARCO TEÓRICO

Las células mieloides son de gran importancia para la inmunidad innata, incluyendo células fagocíticas tanto polimorfonucleares como mononucleares. Un ejemplo de los fagocitos mononucleares son los macrófagos, los cuales, junto con sus precursores, conforman el conocido sistema monocito-macrófago. Entre las principales funciones de los macrófagos está la de fagocitar y eliminar microorganismos para contribuir a la defensa del organismo (Beutler 2004). Además, estas células contribuyen importantemente a regular la homeostasis de los tejidos. Los macrófagos son prodigiosas células fagocíticas que remueven aproximadamente 2×10^{11} eritrocitos cada día, en el bazo, y contribuyen a reciclar cerca de 3 kg de hierro y hemoglobina cada año para que pueda ser reutilizado por el organismo. También son capaces de remover los restos celulares generados durante la remodelación de los tejidos y de fagocitar células que han sufrido apoptosis (Edwards 2008).

Los macrófagos son asimismo capaces de reclutar a otras células mieloides a los sitios de infección, particularmente fagocitos polimorfonucleares, a través de la producción de citocinas quimiotácticas y participan en la respuesta inmune contra patógenos mediante la activación de los linfocitos T efectores (Beutler 2004).

2.1 ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS

Los macrófagos se originan por diferenciación a partir de una célula progenitora mieloides común en la médula ósea, que también es conocida como unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos (UFC-GM). Esta célula también da origen a diferentes tipos de células mieloides como neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas y células cebadas. La UFC-GM se diferencia dando origen a los monoblastos, que a su vez dan

origen a los promonocitos y finalmente a los monocitos, los cuales, son liberados de la medula ósea a sangre periférica (Mosser 2008).

Los monocitos pueden permanecer en circulación o bien migrar a los tejidos, donde por influencias del microambiente darán origen a los macrófagos residentes de tejido. Se han descrito diferentes poblaciones de monocitos en humanos basándose en la expresión de CD14 y CD16: a) monocitos clásicos o inflamatorios que migran a los tejidos en condiciones de inflamación y se caracterizan por el fenotipo $CD14^+CD16^-$, b) monocitos residentes que se encargan de renovar la población de macrófagos residentes, estos monocitos se caracterizan por el fenotipo $CD14^+CD16^+$ (Taylor 2005).

Se han utilizado diferentes marcadores para evaluar la diferenciación de los monocitos a macrófagos. En modelos murinos se utilizan algunas proteínas como el antígeno F4/80 que es expresado en macrófagos de tejidos como células de Langerhans, células de Kupffer y macrófagos de microglía. En humanos se han utilizado la expresión de CD11b, una proteína de la familia de las integrinas que está involucrada en procesos de adhesión en células mieloides como macrófagos, monocitos y granulocitos, y CD68, un miembro de la familia de proteínas de membrana asociadas a lisosomas (Ji 2012).

CD11b ha sido considerado en varios estudios como marcador de macrófagos, en los cuales se ha reportado que al diferenciar monocitos de la línea celular THP-1 con PMA a células tipo macrófagos, estos aumentan la expresión de CD11b (Muñoz 2012, Kang 2014).

2.2 POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS

Los macrófagos son un grupo heterogéneo de células que se encuentran en prácticamente todos los tejidos, en los cuales adquieren fenotipos y nombres distintos, y cumplen diversas funciones para mantener la homeostasis del tejido. Así por ejemplo, tenemos los osteoclastos que participan en la remodelación del hueso; los macrófagos alveolares, que se caracterizan por una expresión incrementada de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y de receptores scavenger en comparación con macrófagos de otros tejidos, con la finalidad de eliminar microorganismos y partículas del ambiente que lleguen a los pulmones; los macrófagos de lamina propia en el intestino, que presentan una mayor capacidad bactericida; macrófagos del sistema nervioso central (microglía, macrófagos perivasculares, macrófagos meníngeos), células de Kupffer en el hígado, y macrófagos esplénicos en el bazo (Taylor 2005).

Aunado a las diferencias fenotípicas que existen entre cada subpoblación de macrófagos según el lugar en donde residen, la marcada plasticidad de los macrófagos les permite responder eficientemente a los estímulos del microambiente modificando su fenotipo, por lo que su fisiología puede ser alterada considerablemente por las respuestas inmunes innata y adaptativa. Al proceso por el cual un macrófago cambia su fenotipo y capacidades funcionales debido a la presencia de citocinas y productos microbianos se le llama “polarización” del macrófago (Murray 2014, Mantovani 2004).

2.3 CLASIFICACIÓN

En un esfuerzo por clasificar a los macrófagos polarizados de manera similar que a los linfocitos T cooperadores (en T_{h1} y T_{h2}), se ha clasificado a estas células en macrófagos M1

y macrófagos M2, utilizando el primer término para referirse a los macrófagos activados clásicamente (activados por citocinas proinflamatorias y productos microbianos), y el segundo término para referirse a los macrófagos activados alternativamente. (Edwards 2008).

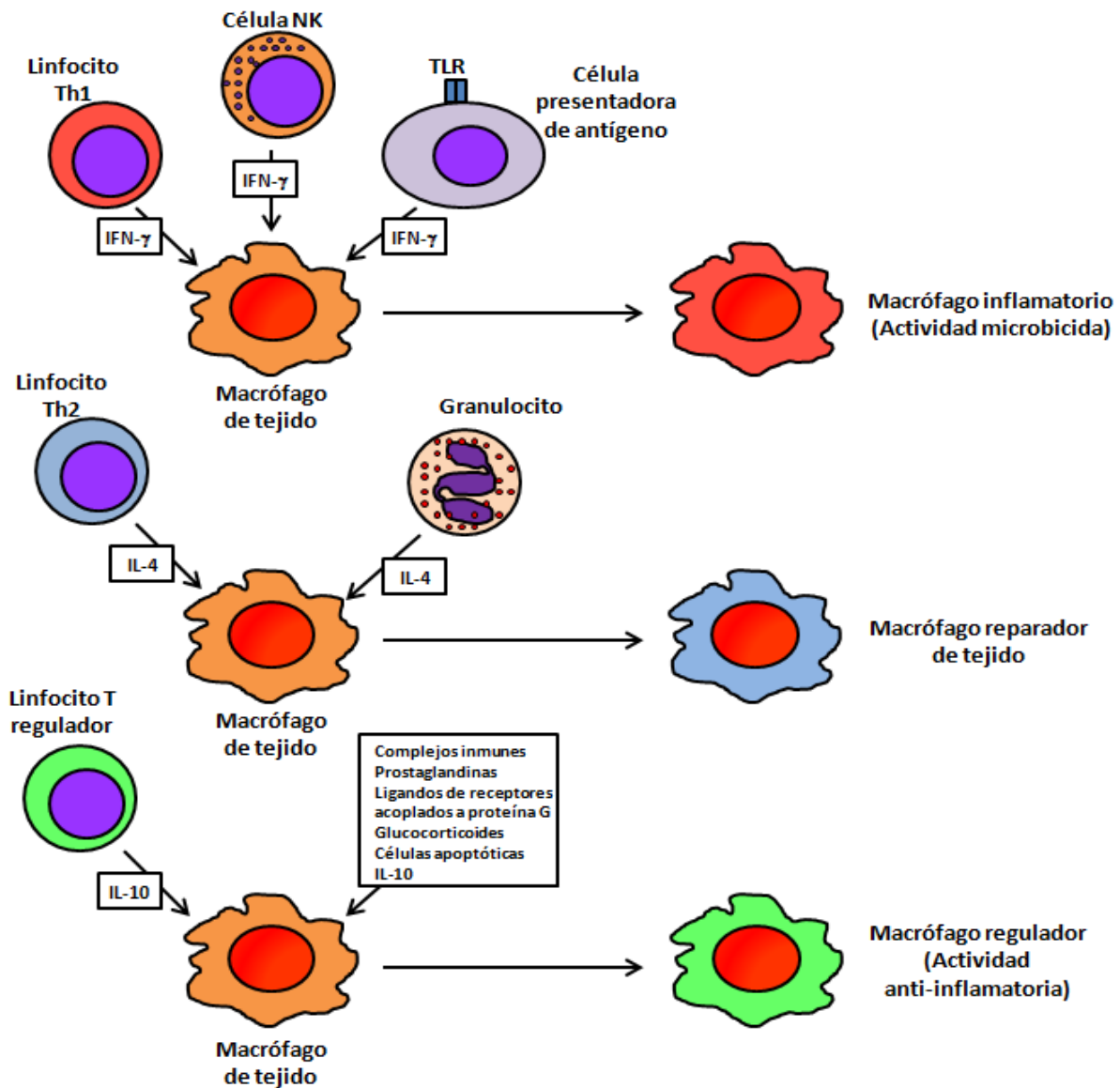


Figura 1. Diferentes subpoblaciones de macrófagos clasificados por sus principales funciones efectoras: defensa del hospedero, reparación de tejidos y regulación inmune (Modificado de Edwards 2008).

Sin embargo, la clasificación M2 ha sido expandida para incluir a otros tipos de macrófagos activados alternativamente que cumplen funciones distintas entre sí, por lo que se ha postulado que hay tres tipos de macrófagos M2: Los macrófagos M2a activados por IL-4 e IL-13 y glucocorticoides, los M2b activados por LPS y complejos inmunes, y los M2c activados por citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β . (Martínez 2008).

Más recientemente, se ha propuesto otra clasificación de los macrófagos basada en las funcionalidades fundamentales que estos cumplen para mantener la homeostasis del organismo. Se han propuesto 3 grupos principales de funciones de los macrófagos: La defensa del hospedero, la reparación de tejidos y la regulación inmune. De acuerdo a esto, se proponen 3 poblaciones “tipo” de macrófagos (Figura 1. Edwards 2008).

2.3.1 Macrófagos inflamatorios (activados clásicamente)

El término de macrófago activado clásicamente se ha utilizado para designar a los macrófagos efectores que se producen durante los procesos inflamatorios (Edwards 2008). La polarización de macrófagos a este estado de activación se favorece con la presencia de citocinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α . El TNF- α exógeno puede inducir esta activación, sin embargo, la presencia de ligandos de receptores tipo Toll (TLR), como el LPS, puede activar a estos macrófagos produciendo TNF- α endógeno (Mosser 2003). Por otro lado, el IFN- γ puede ser producido por células del sistema inmune innato, principalmente por las células NK o NKT, pero esta producción es transitoria por lo que se requiere del IFN- γ producido por los linfocitos Th1 para mantener la activación clásica de los macrófagos y lograr un estado estable de defensa contra microorganismos. La combinación de IFN- γ y

TNF- α resulta en una óptima activación de los macrófagos inflamatorios (Edwards 2008, Zhang y Mosser 2008).

Los macrófagos inflamatorios expresan altos niveles de citocinas proinflamatorias clásicas como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 y TNF- α , producen moléculas que contribuyen a eliminar patógenos como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para aumentar su capacidad microbicida (Mantovani 2004), y participan en la producción de moléculas que inducen respuestas Th1 que han sido asociadas con la eliminación de células tumorales y con la resistencia a infecciones por microorganismos (Goerdts 1999). Los macrófagos M1 expresan altos niveles de moléculas MHC- Clase I y Clase II (Cassol 2010).

Las citocinas proinflamatorias son componentes importantes en la defensa contra patógenos, sin embargo también se ha observado que pueden ocasionar daños severos al hospedero (Edwards 2008).

La activación clásica de los macrófagos tiene importancia en algunas enfermedades. Por ejemplo, se ha observado que en individuos con obesidad, los macrófagos asociados a tejido adiposo pueden cambiar su fenotipo de macrófagos reparadores de tejido (como es común en humanos no obesos) a un fenotipo similar a los macrófagos inflamatorios, los cuales producen citocinas proinflamatorias, lo que puede interferir con la señalización de la insulina y producir diabetes tipo 2 (Edwards 2008, Nagareddy 2014). En cuanto a la participación de esta población de macrófagos en cáncer se ha sugerido que la activación clásica exacerbada puede contribuir con las fases tempranas de la carcinogénesis debido a la producción de citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuales pueden inducir daños al DNA (Mariani 2014). Esto contrasta con el hecho de que se

ha caracterizado a los macrófagos inflamatorios como células con actividad citotóxica para las células tumorales (Romieu-Mourez 2006).

En lo que corresponde a la caracterización de esta subpoblación de macrófagos muchos marcadores han sido descritos en humanos, los cuales son inducidos o sobre regulados por IFN- γ . Entre los más comunes se encuentra la enzima iNOS que produce NO a partir de arginina (Edwards 2008, McWhorter 2013), quimiocinas como CCL15, CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11; algunas moléculas de superficie como MHC-clase II, TLR2, TLR4, CCR7, CD80 y CD86; y producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α . (Cassol 2010, Lauran 2012, Edwards 2008, Jaguin 2013).

2.3.2 Macrófagos reparadores de tejido

De manera similar a los macrófagos inflamatorios, la polarización hacia el fenotipo de macrófagos reparadores de tejido puede inducirse por señales tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. En infecciones por parásitos y hongos se induce la producción de IL-4 e IL-13. Además, se ha observado que la polarización inducida por estas citocinas puede llevarse a cabo en ausencia de productos parasitarios mediante la producción de IL-4 por eosinófilos y células cebadas como respuesta al daño de los tejidos (Loke 2007). Los linfocitos Th2 se producen por la presencia de IL-4, y son estos la principal fuente de esta citocina en la inmunidad adaptativa (Edwards 2008).

Como ya se mencionó, las IL-4 e IL-13 se producen en respuestas Th2, principalmente en reacciones alérgicas o a infecciones por parásitos y patógenos extracelulares, muchos estudios han agrupado los efectos de estas citocinas sobre macrófagos junto con los efectos

producidos por IL-10, sin embargo ha sido evidente que las funciones inducidas por IL-4 e IL-13 son diferentes a las producidas por IL-10 (Gordon 2002).

Varios autores han concluido que los macrófagos tratados con IL-4 presentan una activación alternativa francamente diferente a la activación clásica, esta fue la primera activación alternativa descrita. En estudios con modelos murinos, se ha observado que estos macrófagos contribuyen a la reparación de los tejidos produciendo altos niveles de fibronectina y proteínas asociadas a matriz extracelular. Cuando macrófagos son tratados con citocinas proinflamatorias, se induce la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS), la cual produce NO a partir de arginina; en contraste, cuando los macrófagos son activados alternativamente con IL-4, se induce la arginasa-1 la cual metaboliza la arginina a urea y ornitina, un precursor de poliaminas y prolina (Mosser 2003). Las poliaminas están involucradas en crecimiento y división celular, mientras que la prolina es un componente clave del colágeno, promoviendo así el crecimiento celular y la reparación de los tejidos. Consecuentemente, al no producir NO, los macrófagos reparadores son poco eficientes para eliminar microorganismos intracelulares, a pesar de que se ha observado que sobre expresan moléculas de MHC-Clase II, se reporta que tienen poca eficiencia en la presentación de antígeno y bajo ciertas condiciones pueden inhibir la proliferación de linfocitos T (Mosser 2003).

Los macrófagos reparadores son importantes para el control de infecciones por helmintos; además, han sido relacionados con enfermedades como el asma y las alergias (Cassol 2010).

Esta subpoblación de macrófagos expresa varios marcadores específicos que ya han sido descritos en la literatura. Uno de los primeros receptores reportados es CD206, también conocido como el receptor de manosa, el cual se ha observado desde hace algunos años que incrementa su expresión y actividad en macrófagos tratados con IL-4 y se inhibe con IFN- γ (Stein 1992, Ohlsson 2014).

Los marcadores más utilizados para caracterizar a estos macrófagos involucrados en la reparación de los tejidos en humanos, son: el receptor de manosa y otros receptores tipo lectinas como DC-SIGN (CD209), Dectina-1 (Cassol 2010, Laurant 2012, Chanput 2013) así como algunas quimiocinas, por ejemplo, CCL17, CCL18 y CCL22 (Edwards 2008, Cassol 2010). En modelos murinos se han descrito también marcadores adicionales, como la enzima arginasa, así como YM1, esta última es una proteína de unión a matriz extracelular (Edwards 2008, McWhorter 2013, Jones 2013).

2.3.3 Macrófagos reguladores

Los macrófagos reguladores son otro fenotipo de polarización alternativa diferente a la inducida por IFN- γ ó IL-4, la clasificación M2 de los macrófagos está conformada por macrófagos que contribuyen a la reparación de tejido y a la regulación inmune, sin embargo, en la clasificación de Mosser y Edwards (Edwards 2008) se agrupa en una clasificación independiente a estos macrófagos, cuyas funciones se encuentran enfocadas a la inmunosupresión y resolución del proceso inflamatorio (Jones 2013, Edwards 2008, Mosser 2003, Ohlsson 2014, MacKenzie 2013).

De manera similar a las dos subpoblaciones de macrófagos ya mencionadas, los macrófagos reguladores pueden ser inducidos por respuestas inmunes innatas o

adaptativas. Los estímulos que pueden inducir este fenotipo alternativo de macrófagos incluyen glucocorticoides, citocinas anti-inflamatorias como IL-10, complejos inmunes, células apoptóticas y prostaglandinas (Jones 2013, Edwards 2008, MacKenzie 2013).

Aunque las repuestas neuroendocrinas al estrés no son consideradas respuestas de la inmunidad innata, éstas producen cambios marcados en la fisiología de los macrófagos (Sternberg 2006). Los glucocorticoides liberados por células adrenales en respuesta a estrés son capaces de inhibir la defensa del hospedero y la producción de citocinas proinflamatorias mediada por macrófagos inhibiendo la transcripción de genes de citocinas (Sternberg 2006), también se ha observado que los glucocorticoides promueven en macrófagos la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos (Zhang y Mosser 2008).

Otro estímulo que induce el fenotipo regulador de los macrófagos son los complejos inmunes; se ha reportado que en presencia de productos microbianos o señales endógenas de peligro, los complejos inmunes pueden alterar la producción de citocinas. Estos macrófagos son además altamente fagocíticos y pueden remover restos celulares (Zhang y Mosser 2008).

Los complejos inmunes por si solos no pueden inducir la producción de citocinas en macrófagos pero en combinación con estímulos inflamatorios como LPS, se incrementa la producción de IL-10 y disminuye la producción de IL-12, por lo cual estos macrófagos contribuyen a la resolución de la inflamación (Lucas 2005, Miles 2005, Edwards 2006). Al presentar antígeno estos macrófagos inducen a los linfocitos a un fenotipo Th2 favoreciendo así la producción de IL-4 (Edwards 2006).

Los marcadores característicos de macrófagos reguladores no han sido tan ampliamente descritos, el más comúnmente mencionado es la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10, aunque también se han mencionado otros marcadores que han sido utilizados en estudios para caracterizar a estos macrófagos, estos marcadores son: la enzima esfingosina cinasa-1 (SPHK1) y LIGHT, este último funciona como ligando del mediador de entrada para herpesvirus (HVME), el cual es expresado en linfocitos y provee señales activadoras (Edwards 2008, Edwards 2006, MacKenzie 2014).

El receptor “basura” o scavenger de complejos hemoglobina-haptoglobina también conocido como CD163, fue durante mucho tiempo caracterizado como un marcador de macrófagos M2 e incluso en algunos estudios recientes lo siguen considerando como tal (Lauran 2012, Cassol 2010). Sin embargo, siempre ha estado claro que la sobreexpresión de este receptor está asociada a los macrófagos activados con IL-10 o glucocorticoides (Buechler 2000, Ohlsson 2014, Reinartz 2014), y no a los activados por IL-4 ó IL-13 (Porcheray 2005), por lo que se le ha considerado marcador de macrófagos M2c, los equivalentes a los macrófagos reguladores en la clasificación de Edwards y Mosser (Ohlsson 2014).

2.4 MODULACIÓN DE MARCADORES EN MACRÓFAGOS POLARIZADOS Y CD13

Como se describió anteriormente, se ha observado que el nivel de expresión de muchas moléculas de superficie de macrófagos depende del estado de polarización en el que se encuentren. Como ejemplo, un aumento en la expresión de CD206, es característica de los macrófagos estimulados con IL-4. Otro ejemplo es CD163 que tiene una mayor expresión en los macrófagos estimulados con IL-10 (Tabla 1).

También se ha observado que tanto IFN- γ como IL-10 modulan la expresión de los receptores para la fracción cristalizante de la inmunoglobulina G (Fc γ R) en células del linaje monocito-macrófago (Liu 2005, Karehed 2006). Karehed y colaboradores analizaron la expresión de estos receptores en macrófagos polarizados determinando que se expresan de forma diferente en cada subpoblación.

Tabla 1. Marcadores de polarización de macrófagos humanos y murinos (Modificada de Murray 2014, Mosser 2003, Cassol 2010, Edwards 2008).

		M. Inflamatorios	M. Reparadores	M. Reguladores
Factores de transcripción	Ratón	STAT1,	STAT6, Irf4	STAT3, Nfil3
	Humano	STAT1, IRF5, IRF1, IRF7	IRF4, GATA3	
Proteínas SOCS	Ratón	Socs1	Socs2	Socs3
	Humano		SOCS1	SOCS3
Citocinas	Ratón	IL-12, IL-6, IL-1, TNF- α		IL-10, IL-6
	Humano	IL-12, IL-6, TNF- α , TRAIL		IL-10
Quimiocinas	Ratón		CCL17, CCL24, CCL22	
	Humano	CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5	CCL4, CCL13, CCL14, CCL17, CCL18, CCL20, CCL22, CCL23, CCL24	
Marcadores de membrana	Ratón	MHC-II, CD86,		
	Humano	CCR7, IL1R1, IL2ra, IL-15ra, IL-7r, CD80, CD86, MHC-II, TLR2, TLR4	CD206, STAB1, CD200R, DC-SIGN, CD36, Dectina1, CXCR1, CXCR2, DCIR	CD163, MARCO,
Metabolismo de aminoácidos	Ratón	Ido1, iNOS	Arg1	
Otros	Humano			
	Ratón		YM1, Fizz1	SPHK1, LIGHT
	Humano			

Los marcadores que caracterizan a cada subpoblación de macrófagos son variados y participan en distintas funciones en estas células, entre ellos se encuentran, factores de transcripción, proteínas SOCS, citocinas, quimiocinas, moléculas coestimuladoras, enzimas, receptores de membrana y proteínas asociadas a matriz extracelular (Tabla 1).

Estos marcadores contribuyen con las funciones características de cada estado de polarización de los macrófagos. Tomando en cuenta esta información, nos cuestionamos el papel que juegan las aminopeptidasas en los macrófagos, ya que estas enzimas catalizan la hidrólisis de péptidos y son esenciales para determinar la estabilidad, maduración y activación de proteínas (Zhang 2008). CD13, un miembro de la familia de estas enzimas adquiere importancia en los macrófagos debido a que es ampliamente expresada en células de linaje mieloide, y se ha reportado su participación en distintas funciones atribuidas a monocitos y macrófagos (Mina-Osorio et al, 2008).

También ha sido reportado que CD13 participa en la fagocitosis a través de diferentes receptores en células de linaje monocítico (Villaseñor-Cardoso et al, 2013, Mina-Osorio et al, 2005); además, se ha observado, no solo en células mieloides, la modulación de la expresión de CD13 por citocinas como IFN- γ , IL-10 ó IL-4 (Gabrilovac 2008 y 2010)

2.5 AMINOPEPTIDASA N (CD13/APN)

La aminopeptidasa N es un ectopeptidasa de membrana de la familia de las metaloproteasas dependientes de Zinc (Bauvois 2006). Está ampliamente expresada en células de linaje mieloide y pertenece al grupo de las “proteínas moonlighting” término referido para aquellas proteínas reconocidas por tener funciones múltiples. Algunas funciones reconocidas para CD13 no están relacionadas con su actividad enzimática. El

estudio de estas funciones se ha llevado a cabo empleando anticuerpos monoclonales específicos contra CD13 para entrecruzar esta molécula sobre la membrana de la célula, y determinando las consecuencias funcionales de este entrecruzamiento. También se han estudiado los efectos de la sobreexpresión o el silenciamiento de la proteína en líneas celulares (Mina-Osorio 2008).

La aminopeptidasa N tiene gran importancia médica ya que se ha demostrado que esta molécula es sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer humano, por lo que ha sido sugerida como un posible blanco en terapias anticancerosas, debido a que posee características asociadas al fenotipo de células malignas como proliferación celular, secreción, invasión celular y angiogénesis (Wickstrom 2011).

2.5.1 Estructura de CD13

La aminopeptidasa N o CD13 es una glicoproteína de superficie celular de 150 KDa, el cDNA que codifica para la aminopeptidasa N humana revela una proteína de 967 aminoácidos con 10 sitios potenciales de glicosilación. Contiene un pequeño dominio citosólico de 8 aminoácidos en el extremo N-terminal, un dominio hidrofóbico transmembranal, un tallo rico en serina y treonina y 4 dominios extracelulares dentro de los que se encuentra el sitio catalítico y los sitios de unión a zinc (Figura 2). CD13 es expresado como un homodímero ligado de forma no covalente en la superficie de las células cuyas dimensiones son de 131 x 62 Å (Wong 2012). El gen de la aminopeptidasa N humana contiene 20 exones y se localiza en el brazo largo del cromosoma 15 (15q) (Zhang y Xu 2008).

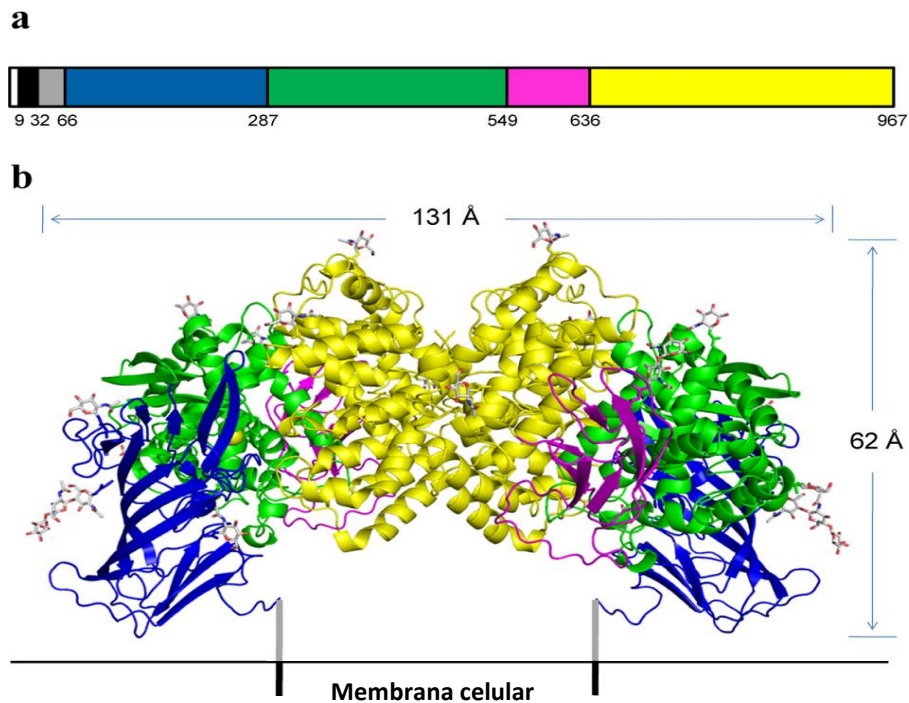


Figura 2. Estructura del dímero de la aminopeptidasa N. Organización de los dominios de la cadena polipeptídica de CD13 humano. El dominio citoplasmático es negro, el segmento transmembranal es negro, el segmento rico en serina y treonina es gris, y los cuatro dominios restantes (I, II, III, IV) están coloreados en azul verde, magenta y amarillo respectivamente (Modificada de Wong 2012).

2.5.2 Actividad enzimática

CD13 tiene actividad de aminopeptidasa N con preferencia por cortar aminoácidos neutros. Remueve aminoácidos N-terminales de oligopéptidos no sustituidos con excepción de los péptidos que contienen prolina en su penúltima posición. Debido a esta función CD13 puede regular la actividad de numerosos péptidos que participan en importantes procesos biológicos como encefalinas, angiotensinas, cininas, citocinas, quimiocinas o proteínas de matriz extracelular entre otras (Mina-Osorio 2008).

CD13 también podría estar participando en quimiotaxis, ya que se reportó una correlación entre el número de linfocitos T y la actividad enzimática de la aminopeptidasa N en fluido broncoalveolar de pacientes de sarcoidosis; además, se concluyó que CD13 induce quimiotaxis de linfocitos *in vitro*, fenómeno que puede ser inhibido con el uso de bestatina, un conocido inhibidor de la actividad enzimática de CD13 (Tani 2000). Se ha propuesto que CD13 participa en la degradación y modulación de varias quimiocinas, lo que tendrá una influencia en la migración de distintas células.

2.5.3 Endocitosis

Una de las funciones mejor descritas de CD13 es su rol como receptor de varios virus, como el coronavirus humano 229E. A este respecto, se ha reportado que ni el uso de inhibidores de la actividad enzimática ni mutaciones en el sitio activo de CD13 afecta la unión del virus (Mina-Osorio 2008). También hay reportes que implican a CD13 en la infección por citomegalovirus humano (Soderberg 1993, Gredmark 2004).

2.5.4 Transducción de señales

La capacidad de CD13 de inducir transducción de señales es un mecanismo de acción propuesto para explicar las funciones de CD13 que son independientes de su actividad enzimática. Sin embargo, como se describió anteriormente, CD13 posee solo un pequeño dominio intracelular de 8 aminoácidos que hasta hace poco se pensaba que no contenía ningún motivo de señalización, y que la capacidad de señalizar de la aminopeptidasa N dependía de su asociación con otras proteínas auxiliares (Sjostrom 2000).

Posteriormente se demostró que el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos monoclonales específicos induce la fosforilación de proteincinasas activadas por mitógenos

(MAPK) como ERK1/2, JNK y p38, así como un aumento en la concentración de calcio en monocitos. Estudios con inhibidores farmacológicos indican que PI3K participa en la cascada de señalización intracelular inducida por anticuerpos monoclonales anti CD13 (Navarrete 2000).

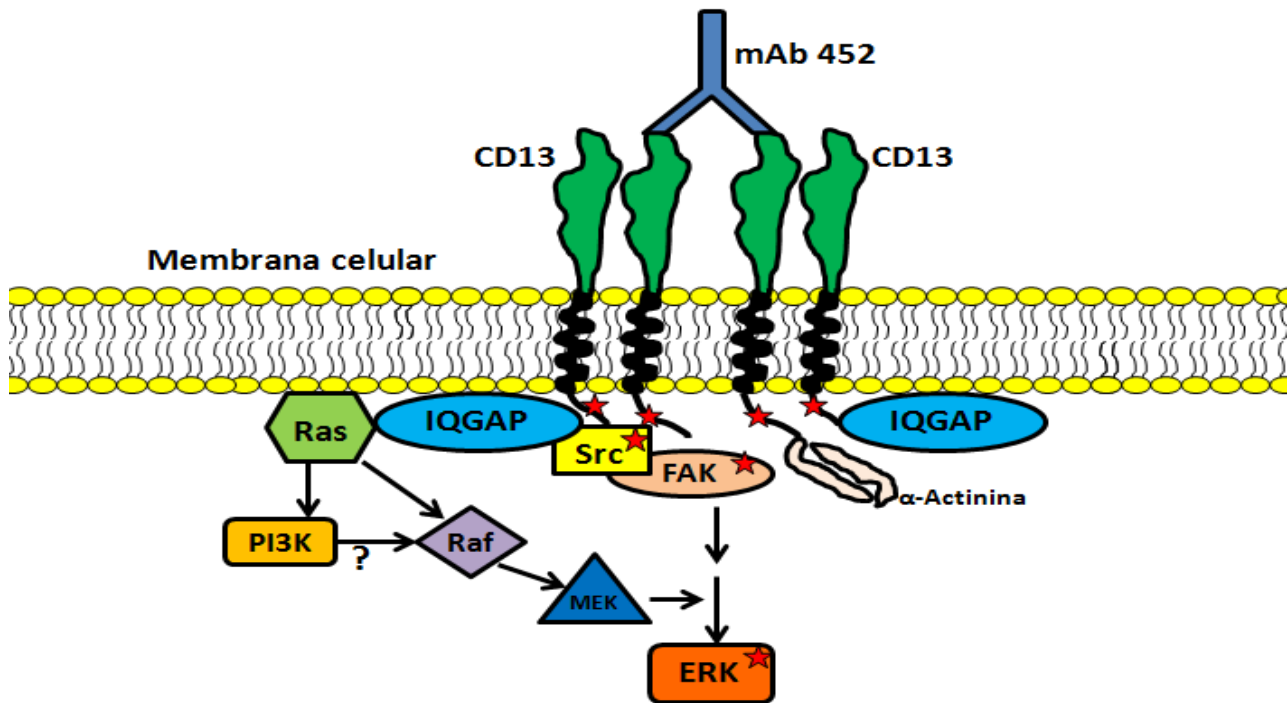


Figura 3. Esquema de señalización de CD13. El entrecruzamiento de CD13 con anticuerpo 452 induce fosforilación del dominio citoplásmico de CD13 así como la activación de las cinasas Src, FAK y ERK , además, potencia otros componentes de las vías Ras/MAPK y PI3K (Modificada de Subramani 2013).

Recientemente se demostró que la adhesión celular inducida tras entrecruzar CD13 en monocitos de la línea celular U-937 depende de la fosforilación de Src, FAK y ERK (Figura 3); además, CD13 puede fosforilarse de manera dependiente de Src, la tirosina 6 mostro ser de gran importancia para procesos de adhesión y trafico celular, ya que mutaciones de este

aminoácido producen una inhibición de estos procesos. Estos resultados demostraron que el dominio citoplásmico de CD13 participa en las cascadas de señalización de monocitos (Subramani 2013).

2.5.5 Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso utilizado por células especializadas como células dendríticas, macrófagos y neutrófilos para internalizar partículas, microorganismos o debris celular (Deschamps 2013). Se considera fagocitosis cuando las partículas internalizadas tienen un diámetro mayor a $0.5 \mu\text{M}$ (Meléndez 2008, Kerrigan 2008, Groves 2008, Goodridge 2012).

Se ha sugerido que CD13 puede participar en procesos de fagocitosis. En estudios iniciales, se propuso que la transducción de señales por anticuerpos específicos de CD13 podría ser resultado de la formación de complejos entre CD13 y los $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ (MacIntyre 1989), Tokuda y Levy reportaron que la expresión de CD13 se correlaciona con la fagocitosis ya que encontraron que células que poseen una alta capacidad fagocítica expresan niveles más de dos veces mayores de CD13 que células con baja capacidad fagocítica (Tokuda 1996).

Posteriormente se observó que CD13 se co-localiza en la membrana celular con los $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ (Riemann 2005) y que durante la fagocitosis mediada por estos receptores, CD13 se redistribuye a la copa fagocítica y es internalizado dentro de los fagosomas (Mina-Osorio 2005).

Aunado a lo anterior, ha sido reportado que eritrocitos de carnero que interactúan con la membrana celular de monocitos tanto a través de CD13 como a través de $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ son fagocitados de forma más eficiente que los que interactúan únicamente a través de $\text{Fc}\gamma\text{RI}$.

Esto, sumado al hecho de que entrecruzar CD13 y Fc γ RI simultáneamente mediante anticuerpos monoclonales específicos se incrementan los niveles y la duración de la fosforilación de Syk comparándolo con lo obtenido solo al entrecruzar el Fc γ RI, demuestra que CD13 modula la fagocitosis a través de receptores Fc γ en la membrana de los monocitos y participa en la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG (Mina-Osorio 2005).

Tiempo después se investigó una posible cooperación entre CD13 y receptores de la inmunidad innata en células dendríticas y macrófagos. Se encontró que el entrecruzamiento de CD13 modula de forma positiva la fagocitosis de partículas de zymosan y de bacterias, y que CD13 es internalizado en el fagosoma durante la fagocitosis de zymosan, sugiriendo que la aminopeptidasa N participa en procesos fagocíticos de células dendríticas y macrófagos (Villaseñor-Cardoso, 2013).

Recientemente, en este laboratorio, se encontró que CD13 no solo participa modulando la fagocitosis a través de otros receptores, sino que el entrecruzamiento de CD13 es capaz de inducir fagocitosis por sí mismo en monocitos y macrófagos.

Con base a las evidencias anteriores, CD13 ha sido propuesto como un receptor fagocítico y es conocido por ser una proteína multifuncional. Muchas de estas funciones podrían contribuir, en los macrófagos, a realizar con mayor eficiencia algunas funciones. Se ha observado que varios receptores y moléculas de superficie celular tienen una expresión modulada en los distintos estados de polarización de los macrófagos, por lo que en este trabajo caracterizaremos la expresión de CD13 así como la modulación de la fagocitosis a través de esta molécula en macrófagos polarizados con diferentes estímulos.

3. JUSTIFICACIÓN

El fenotipo de los macrófagos es alterado por el microambiente circundante; estos cambios fenotípicos contribuirán a que la célula realice con mayor eficiencia funciones específicas. Aunque se reconoce que los posibles estados de polarización en que pueden encontrarse los macrófagos forman un continuo, se han propuesto 3 tipos básicos de macrófagos activados, de acuerdo a las funciones para las que cada uno de estos contribuye más eficientemente. Estos 3 tipos básicos son: macrófagos inflamatorios, macrófagos reguladores de la respuesta inmune y macrófagos reparadores de tejido.

La expresión de diferentes receptores y moléculas es modulada de acuerdo al estado de polarización de los macrófagos lo cual repercute en la eficiencia de cada una de las subpoblaciones de macrófagos para realizar sus funciones. La plasticidad de estas células y la presencia de estados intermedios de polarización dificultan su caracterización, por lo que el estudio de la modulación de nuevas moléculas en los macrófagos polarizados ha cobrado gran importancia para comprender su participación en la defensa del hospedero y homeostasis de los tejidos.

Entre las moléculas expresadas en células mieloides, las aminopeptidasas son de gran importancia debido a su participación en la regulación, activación y maduración de distintas proteínas efectoras, por lo que juegan un papel crucial en la funcionalidad de las células. Dentro de las aminopeptidasas, la aminopeptidasa N (CD13) es importante en los macrófagos debido a su participación en distintos procesos característicos de estas células y que podrían contribuir a la funcionalidad de los macrófagos en sus estados de polarización.

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que CD13 es capaz de inducir fagocitosis en macrófagos y monocitos, y que participa en la fagocitosis a través de otros receptores, por lo que consideramos de gran importancia caracterizar la expresión de esta molécula (CD13), en los diferentes estados de polarización de los macrófagos y determinar si esta expresión se correlaciona con la capacidad fagocítica de los distintos fenotipos de polarización de macrófagos.

4. HIPÓTESIS

La polarización *in vitro* de macrófagos humanos a los distintos estados de polarización: inflamatorios, reguladores y reparadores de tejido, modulará diferencialmente los niveles de expresión de la aminopeptidasa N en cada subpoblación, lo cual, tendrá un efecto en la capacidad fagocítica a través este receptor.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la modulación de la expresión y la capacidad fagocítica de la aminopeptidasa N (CD13) en las diferentes subpoblaciones de macrófagos polarizados en un modelo de estudio *in vitro*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar ensayos de diferenciación *in vitro* de células monocíticas THP-1 a células tipo macrófago.
- Realizar ensayos *in vitro* de polarización de células tipo a macrófago a: macrófagos inflamatorios, reguladores y reparadores de tejido.

- Determinar la expresión en membrana de CD13 en macrófagos humanos con distintos estados de activación.
- Determinar la expresión del RNA mensajero de CD13 en macrófagos humanos con distintos estados de activación.
- Determinar la capacidad fagocítica a través de CD13 en macrófagos humanos con distintos estados de activación.

6. METODOLOGÍA

6.1 GENERACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE MACRÓFAGOS

6.1.1 Diferenciación de células THP-1 a células tipo macrófagos

Para la obtención de células tipo macrófagos se utilizó la línea celular de leucemia monocítica THP-1 (ATCC), las cuales fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (GIBCO) adicionado con piruvato de sodio 1 mM, solución de aminoácidos no esenciales 0.1 mM, 0.1 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina; y con suero fetal bovino (GIBCO) al 10%, a una densidad celular entre 2×10^5 y 1×10^6 células por mililitro.

Se utilizaron placas de 6 pozos (NUNC) en donde fueron incubadas 5×10^5 células por pozo en 2 mL de medio de cultivo con una concentración final de 20 nM de acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma-Aldrich), durante cinco días a 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, haciendo un cambio de medio con PMA al día 3. En el día 5 se retiró el medio con PMA, lavando para eliminar las células no adheridas a la placa, y agregando medio de cultivo sin PMA para incubar las células adheridas por 3 días más.

Estas células fueron caracterizadas con un fenotipo tipo macrófago basándose en su morfología y expresión del marcador CD11b, este último determinado mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti CD11b conjugado con ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen) a través de una inmunofluorescencia directa.

6.1.2 Polarización de macrófagos con distintos estímulos de activación

Después de la incubación de 3 días sin PMA, las células, se lavaron y estimularon con la citocina indicada a las concentraciones correspondientes en un volumen final de 2 mL en medio de cultivo. Para la generación de macrófagos inflamatorios se adicionó IFN- γ (Peprotech) a una concentración final de 30 ng/mL, para la obtención de macrófagos reparadores de tejido las células fueron estimuladas con IL-4 (Peprotech) a una concentración final de 40 ng/mL, y finalmente, los macrófagos reguladores fueron generados mediante estimulación con IL-10 (Peprotech) a una concentración de 20 ng/mL.

Las células fueron incubadas con las respectivas citocinas durante 48h a 37°C y con 5% de CO₂. La determinación de la expresión de los marcadores se realizó por citometría de flujo, mediante una inmunofluorescencia directa.

Para evaluar la polarización hacia macrófagos inflamatorios se determinó la expresión de la molécula coestimuladora CD80, la cual fue determinada con un anticuerpo anti CD80 conjugado con alofocianina (APC) (Biolegend). La polarización de los macrófagos reparadores de tejido fue evaluada mediante la expresión del receptor de manosa (CD206), haciendo uso de un anticuerpo anti CD206 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Biolegend). Y por último, el efecto de la estimulación con IL-10 para generar

macrófagos reguladores fue evaluado por la expresión de CD163 con un anticuerpo anti CD163 conjugado con ficoeritrina (PE) (Biolegend).

En el caso de células adheridas a la placa, estas fueron incubadas con EDTA 10 mM en PBS 1X frío durante 5 minutos en hielo para después despegarlas por pipeteo. Las células despegadas fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 3 minutos, resuspendidas en medio RPMI con 10% de SFB y se contaron en una cámara de Neubauer para su uso posterior.

6.2 CITOMETRÍA DE FLUJO

6.2.1 Inmunofluorescencia directa

Para la determinación de la expresión de marcadores por citometría de flujo, se utilizaron 2×10^5 células resuspendidas en 200 μ L de amortiguador de lavados (PBS 1X, SFB 5%, azida de sodio 0.01%), que fueron colocadas en una placa de 96 pozos con fondo en “U” (Corning). Posteriormente se agregaron 10 μ L del anticuerpo anti CD11b-PE ó 3 μ L de los anticuerpos anti CD206-FITC, anti CD163-PE y anti CD80-APC según sea el caso. Las placas fueron incubadas protegidas de la luz, a 4°C, por 30 minutos con agitación ocasional. A continuación las células fueron lavadas 2 veces con 200 μ L de amortiguador para lavados, centrifugando a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 minutos (Centrifuga 5810R, Eppendorf) y se decantó el sobrenadante. Posteriormente un último lavado fue realizado con 200 μ L de PBS 1X frío y las células se resuspendieron en 200 μ L de solución de fijado (PFA 1% en PBS). La intensidad media de fluorescencia fue el criterio utilizado para el análisis de las subpoblaciones de macrófagos polarizados.

6.2.2 Inmunofluorescencia indirecta

Para determinar la expresión de CD13 se realizó una inmunofluorescencia indirecta. Las células fueron resuspendidas a una concentración de 2×10^5 células en 100 μ L de amortiguador de lavados y se colocaron en una placa de 96 pozos fondo en "U" (Corning). Posteriormente se adicionaron 5 μ L de anticuerpo primario anti CD13 (anticuerpo monoclonal murino, clona 452, concentración 1.2 μ g/ μ L). Las células fueron incubadas a 4°C por 30 minutos con agitación ocasional. Al terminar la incubación, las células fueron lavadas tres veces con amortiguador para lavados, centrifugando a 2000 rpm por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 100 μ L del amortiguador de lavados con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:500 (Cabra anti ratón conjugado con FITC, Zymed). Se incubaron las células cubiertas de la luz a 4 °C por 30 minutos con agitación ocasional. Después de esta incubación las células fueron lavadas 2 veces con 200 μ L de amortiguador para lavados, centrifugando a 2000 rpm por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. Se realizó un último lavado con 200 μ L de PBS 1X frío y se resuspendió el pellet en 200 μ L de paraformaldehído (PFA/PBS) al 1%. La intensidad media de fluorescencia fue el parámetro utilizado para determinar la expresión de CD13 en las subpoblaciones de macrófagos polarizados.

6.3 BIOLOGÍA MOLÉCULAR

6.3.1 Diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real

La cuantificación de la expresión del RNA mensajero se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real con oligonucleótidos diseñados para amplificar el mensajero de CD13 y de HPRT1 (hipoxantina fosforribosiltransferasa 1) utilizado como gen endógeno (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para los ensayos de PCR en tiempo real.

HPRT-1	Secuencia (5'->3')	Número de bases	Tm (°C)	GC%	Exón	Sec Rec
Forward	TTATGGACAGGACTGAACGTCTTG	24	60.56	45.83	2-3	292-405
Reverse	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATT	21	59.11	47.62		
CD13	Secuencia (5'->3')	Número De bases	Tm (°C)	GC%	Exón	Sec Rec
Forward	GGCCCCATCCTTA ACTTCT	19	56.37	52.63	5-6	1256-1328
Reverse	GGCCAATCTGGTCTGATTTTG	21	57.48	47.62		

Los oligonucleótidos fueron diseñados con ayuda de los programas PrimerBlast, de NCBI y Primer Express de Applied, y fueron sintetizados por Invitrogen. Para el diseño se utilizó una estrategia en la cual ambos oligonucleótidos (forward y reverse) sólo reconocieran secuencias del RNA procesado, posterior a la incisión de intrones; por lo cual sólo se reconocerán y amplificarán secuencias codificadas en exones.

6.3.2 Extracción de RNA

Se colocaron 1×10^6 células en un microtubo de 1.5 mL (Axygen), fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 segundos para generar un pellet (Centrifuga 5415C, Eppendorf). Se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1mL de Trizol Reagent (Invitrogen) y el botón celular se resuspendió por pipeteo para lograr la lisis completa de las células. Posteriormente se agregaron 200 μ L de cloroformo (99% para biología molecular, Sigma-Aldrich), agitando vigorosamente por 15 segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Para

realizar la separación de las fases se centrifugó a 11000 g por 15 minutos a una temperatura de 4°C (Centrifuga 5810R, Eppendorf).

El RNA se recuperó de la fase acuosa, colectando en un tubo nuevo de 1.5mL aproximadamente 400 µL después de la centrifugación, al cual se le adicionaron 500µL de isopropanol (99,5% grado HPLC, Sigma-Aldrich) para precipitar el RNA. La muestra se incubó por 10 min a temperatura ambiente, y fue centrifugada a 11000g por 10 minutos a una temperatura de 4°C. El pellet obtenido es el RNA precipitado.

El sobrenadante fue desechado y se procedió a lavar 2 veces el RNA, agregando 1mL de etanol al 75%, agitando en un vortex (Vortex Genie 2) por 15 segundos y centrifugando las muestras a 7500 g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el RNA se dejó secar a temperatura ambiente por unos 5 minutos aproximadamente ó hasta que ya no se observaran gotas de etanol alrededor del botón. Una vez secó el botón, se disolvió el RNA en 10µL de agua libre de RNAsas o agua inyectable por cada millón de células inicial.

Para monitorear la calidad y cantidad del RNA obtenido, se llevó a cabo la cuantificación del RNA por espectrofotometría, contra un blanco de agua. La lectura de absorbancia fue leída en 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 $A_{260nm}=1$ corresponde a 40ng/µL de RNA, quedando la siguiente ecuación:

$$(A_{260 \text{ nm}})(40 \text{ ng}/\mu\text{L}) = [\text{RNA}]\text{ng}/\mu\text{L}$$

La presencia de proteínas y sales pueden interferir en las reacciones posteriores, por lo que es necesario que la relación entre la cantidad de RNA y proteínas (A_{260}/A_{280}) sea mayor a 1.8, y la relación (A_{260}/A_{230}) sea mayor a 1.7.

La integridad del RNA se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. La electroforesis se realizó con una cantidad de RNA de entre 0.8-1.0 µg con 3 µL de buffer de carga, llevando a un volumen total de 7 µL por pozo con agua libre de RNAsas. Las condiciones de corrida para el gel de agarosa fueron 90V por 30 minutos. Después de esto se tiñó el gel durante 10 minutos en una solución diluida de bromuro de etidio (Fluka, BioChemika) y posteriormente fue observado mediante un transiluminador con luz UV (Gel Doc 2000, Bio-Rad), utilizando el programa Quantity One. La presencia de dos bandas definidas que representan las dos subunidades de RNA ribosomal (18s y 28s) indican una buena integridad del RNA en la muestra.

6.3.3 Tratamiento con DNAsa

Para eliminar la contaminación con DNA genómico en las muestras de RNA extraído, se llevó a cabo un tratamiento con DNAsa (Turbo DNAsa-free kit, Applied Biosystem). Se utilizaron 10 µg de RNA, se adicionó 0.1 del volumen inicial de RNA para tratar de Turbo DNAsa buffer 10X y 1µL de Turbo DNAsa, agitando suavemente.

Las muestras se incubaron a 37°C por 20 minutos. Al finalizar este periodo de tiempo se detuvo la reacción adicionando 2µL de reactivo para inactivación de la DNAsa, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente. Se centrifugó a 10 000 g por 2 minutos y se transfirió el RNA (sobrenadante) a un tubo nuevo de 0.6 mL (Axygen). Para demostrar que durante el tratamiento con la DNAsa el RNA no fue degradado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

6.3.4 Reacción de retrotranscripción (síntesis de cDNA)

Se realizó la síntesis del DNA complementario (cDNA) haciendo uso de la retrotranscriptasa reversa M-MLV (Promega). Para esto, en un tubo de 0.2 mL se colocaron 1 µg de RNA, 1µL de Oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) y agua libre de RNAsas a un volumen final de 14µL. Se llevó a cabo una incubación a 70°C por 5 minutos en un termociclador (Corbett Research, modelo CG1-96) y se colocó a 4°C al término de este tiempo por al menos un minuto.

Después de este tiempo se agregaron en el siguiente orden: 4µL de Buffer M-MLV 5X (Promega), 1µL de dNTPs 10mM (Invitrogen) y 1µL de retrotranscriptasa reversa M-MLV (Promega). El ciclo utilizado para la retrotranscripción fue de 37°C por 60 minutos y 75°C por 15 minutos en un termociclador. El cDNA de cada muestra se congeló a -20°C hasta su uso en las reacciones de PCR en tiempo real posteriores.

6.3.5 PCR en tiempo real

Se realizó una mezcla maestra para las reacciones de PCR en tiempo real con todos los reactivos a excepción del DNA complementario. La mezcla de reacción se colocó en tubos o placas para PCR (MicroAmp), según conviniera en el ensayo, y se adicionó el cDNA. Cada mezcla de reacción de un volumen final de 10 µL por tubo se preparó en las condiciones indicadas en la tabla 3:

Tabla 3. Mezcla de reacción para PCR tiempo real.

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

Fue utilizado el siguiente programa de ciclos para la reacción de PCR donde la lectura de fluorescencia fue realizada durante el alineamiento de los oligonucleótidos.

Tabla 4. Programa de ciclos para PCR tiempo real.

Temperatura	Tiempo	# de ciclos
50°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15 s	40
60°C	1 min	

Debido a que se utilizó SYBR Green como sistema de detección, se realizó una curva de disociación (melting curve) al finalizar los ciclos, para determinar la especificidad de la reacción.

6.4 FAGOCITOSIS SELECTIVA A TRAVÉS DE CD13

6.4.1 Tinción de eritrocitos con CFSE

Un volumen de 500 µL de eritrocitos de carnero en solución de Alsevers fue colocado en un tubo de 1.5 mL (Axygen), se centrifugó a 14000 rpm por 10 segundos (Centrifuga Eppendorf 5415C) para desechar el sobrenadante. Los eritrocitos fueron lavados 7 veces con 750 µL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) con albumina sérica bovina al 0.1% (PBS/BSA) centrifugando a 14000 rpm 10 segundos para finalmente resuspender los eritrocitos en 1 mL de PBS/BSA.

Un volumen de la suspensión anterior equivalente a 1200×10^6 eritrocitos fue colocado en un tubo de 15 mL (Falcon), al cual se adicionó PBS/BSA para llevar a un volumen final de 4 mL

y se agregaron 25 μ L de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE, Invitrogen) a una concentración de 10 mM. Se incubaron 30 minutos a 37°C cubiertos de la luz, al finalizar este periodo de tiempo se adicionaron 2.5 mL de PBS/BSA y 2.5 mL de suero fetal bovino (GIBCO) incubando 20 minutos más a 37 °C para detener la reacción.

Posteriormente los eritrocitos fueron centrifugados a 3500 rpm por 3 minutos (Centrifuga 5810R, Eppendorf), se desechó el sobrenadante y se lavaron 3 veces con 7 mL de PBS/BSA. Finalmente se resuspendieron en 1 mL de PBS/BSA y fueron almacenados a 4 °C cubiertos de la luz.

6.4.2 Marcaje de eritrocitos con fragmentos F(ab)₂ cabra anti-inmunoglobulinas (Ig) de ratón

Al día siguiente de la tinción con CFSE los eritrocitos fueron lavados 7 veces con 750 μ L de PBS 1X sin BSA centrifugando a 14000 rpm durante 15 segundos y desechando el sobrenadante, al finalizar los lavados se resuspendió el botón de eritrocitos en 750 μ L de PBS 1X y se adicionaron 250 μ L de una disolución de N-hidroxi-succinimidil-biotina (EZ-link Sulfo-NHS-Biot, Thermo Scientific) a 1 μ g/ μ L en PBS 1X. Se incubaron 20 minutos a 4°C con agitación constante.

Después de la incubación, los eritrocitos se lavaron 7 veces con PBS/BSA al 0.1% centrifugando por aproximadamente 10 segundos y desechando el sobrenadante, el botón se resuspendió en 1 mL de PBS/BSA y se dividió en 2 tubos Eppendorf de 1.5 mL los cuales se centrifugaron por aproximadamente 10 segundos y se desecharon los sobrenadantes. Posteriormente los botones resultantes se resuspendieron en 430 μ L de PBS/BSA, a cada

uno de los cuales se les adicionó 70 μL de una disolución de estreptavidina a 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en PBS 1X y se incubaron 20 minutos a 4°C.

Los eritrocitos cubiertos con estreptavidina de ambos tubos se mezclaron y se lavaron 7 veces con PBS/BSA 0.1% centrifugando y desechando el sobrenadante. Los eritrocitos fueron divididos nuevamente en dos tubos, se resuspendió cada botón en 375 μL de PBS/BSA 0.1%, a cada uno se le adicionaron 1.25 μL de fragmentos F(ab)'_2 biotinilado cabra anti-Ig de ratón (Zymed) y fueron incubados por 45 minutos a 4°C, posteriormente se mezcló el contenido de ambos tubos y se lavó 7 veces con PBS/BSA. Los eritrocitos se resuspendieron finalmente en 1 mL de PBS/BSA para su uso.

6.4.3 Ensayos de fagocitosis

En un tubo de 1.5 mL (Axygen) se colocaron 5×10^5 células (THP-1 ó macrófagos) y fueron resuspendidas en 200 μL de RPMI con 10 % de SFB (GIBCO), se adicionó según sea el caso 1 μg de Fab anti CD13 (clona 452) ó 2 μg de anticuerpo anti $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ (clona 32.2) para incubarlas por 45 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se centrifugaron por aproximadamente 10 segundos, se lavaron 3 veces y se resuspendieron con 400 μL de RPMI con 10% de SFB.

Se adicionaron 5×10^6 eritrocitos opsonizados a las células (proporción 1:10), se mezclaron y dividieron en 2 tubos (200 μL en cada uno), los cuales se centrifugaron por aproximadamente 10 segundos y fueron incubados, un tubo a 4°C y el otro a 37 °C durante 1 hora.

Una vez transcurrido el tiempo de la fagocitosis, el sobrenadante fue retirado, se resuspendió el botón de células y eritrocitos, los eritrocitos no fagocitados fueron lisados

agregando 810 μL de agua bidestilada fría por 1 minuto a temperatura ambiente, se detuvo la lisis con 90 μL de PBS 10X, las células fueron centrifugadas por aproximadamente 10 segundos y resuspendidas en 400 μL de amortiguador para lavados, fueron centrifugadas nuevamente y fijadas con 400 μL de PFA al 1%. Para apagar la fluorescencia externa de las células se adicionó azul tripan 0.2% en buffer de citratos (pH 4.5) en una proporción 1:1 antes de leer en el citómetro. El porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia fueron los criterios utilizados para el análisis de las subpoblaciones de macrófagos polarizados.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la significancia estadística entre los resultados observados con las diferentes subpoblaciones de macrófagos se utilizaron como pruebas estadísticas, el análisis de varianza (ANOVA de un solo factor) y la prueba t de Student como análisis post ANOVA, con el uso del programa GraphPad Prisma 5.0.

7. RESULTADOS

7.1 DIFERENCIACIÓN CELULAR DE MONOCITOS A CÉLULAS TIPO MACRÓFAGOS

Para evaluar el efecto de la polarización de los macrófagos sobre la expresión de CD13 y la fagocitosis a través de este receptor, utilizamos la línea celular monocítica THP-1. Para la obtención de macrófagos a partir de estas células se indujo *in vitro* su diferenciación a células con un fenotipo similar al de los macrófagos sin polarizar (Mac).

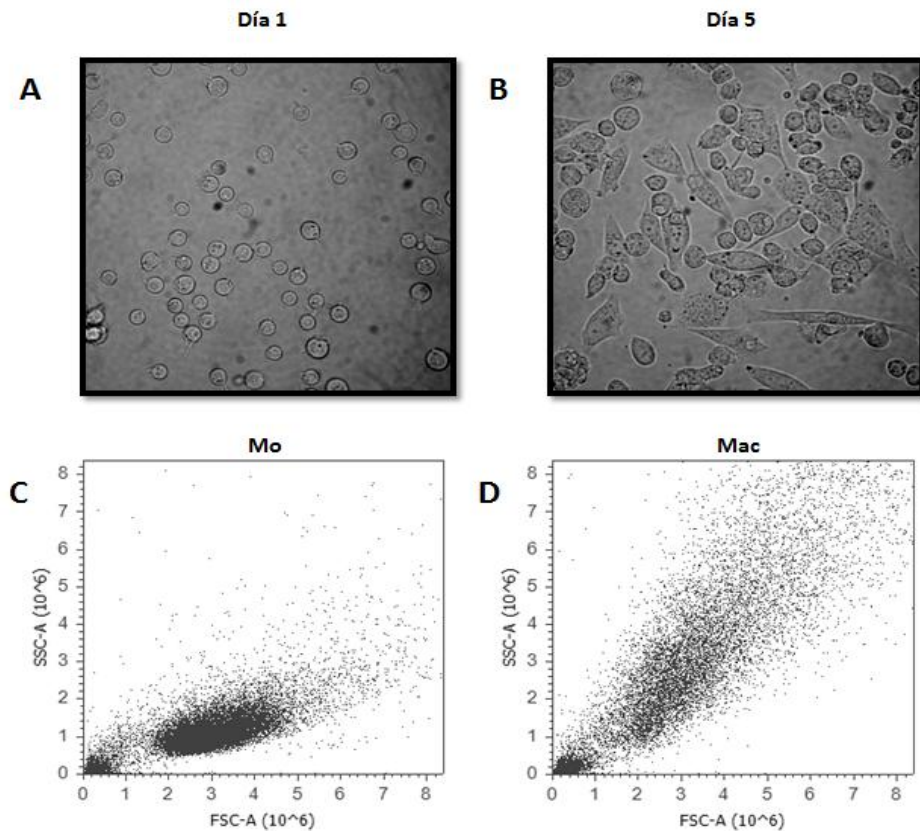


Figura 4. Comparación de las características morfológicas de las células THP-1 (Mo) y células THP-1 tratadas con PMA (Células tipo macrófago; Mac). (A, B) Fotografías de microscopía óptica 40X de células THP-1 sin tratamiento (Mo) y células tipo macrófagos en el día 5 del tratamiento con PMA (Mac). (C, D) Gráficos de puntos de granularidad (SSC-A) contra tamaño (FSC-A) de células THP-1 y células tipo macrófagos después de 5 días de incubación con PMA y 3 días de descanso en medio de cultivo libre de PMA.

Como se describió anteriormente, las células monocíticas de la línea celular THP-1 (Mo) fueron tratadas con PMA durante 5 días, dentro de los cuales cada 2 días se reemplazó el medio con nuevo RPMI completo adicionado más PMA, para inducir la diferenciación a células tipo macrófagos (Mac), posteriormente las células fueron incubadas en medio de cultivo libre de PMA durante 3 días más (Figura C1). Los monocitos presentaron cambios en

la morfología durante el tratamiento con PMA, se observó aumento en tamaño y en granularidad; además, las Mac se adherieron a la placa de cultivo y presentan prolongaciones de la membrana celular en contraste con los monocitos sin tratamiento, los cuales permanecieron en suspensión en el medio de cultivo (Figuras 4A, 4B).

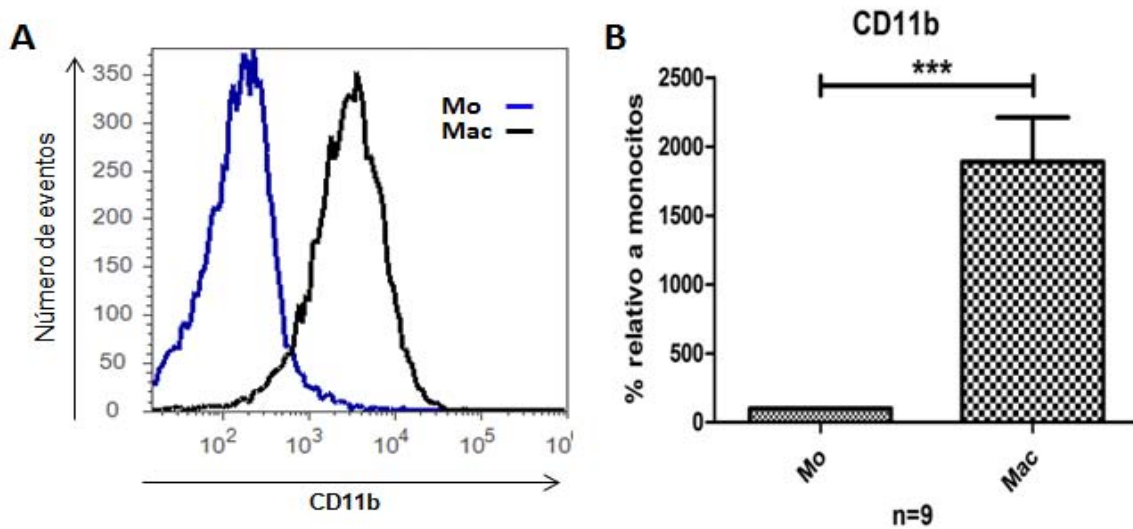


Figura 5. Expresión de CD11b en monocitos y células tipo macrófagos después del proceso de diferenciación. Como criterio de diferenciación a macrófagos se cuantificó la expresión de CD11b. (A) Histograma representativo de la expresión de CD11b, la línea azul representa a los monocitos (Mo) y la negra a las células tipo macrófagos (Mac). (B) Gráfico de barras que representa el promedio de 9 experimentos independientes como porcentaje relativo, el cual fue calculado con la IMF de la expresión de CD11b con respecto a los monocitos (100%); las barras de error representan el error estándar de la media (EEM), ***p<0.001 de una prueba t-Student pareada.

Una vez determinado que las células mostraban los cambios morfológicos esperados, estas fueron analizadas mediante citometría de flujo, con lo cual se confirmó lo observado por microscopía óptica, el tamaño y la granularidad de los macrófagos aumenta en comparación

con los monocitos (Figuras 4C, 4D). Adicional a la morfología, se utilizó como criterio de diferenciación a macrófagos la expresión del marcador de superficie CD11b, una integrina beta-2 que forma parte del receptor 3 de complemento (CR3). Los resultados muestran un aumento de aproximadamente 20 veces la expresión de esta molécula en las Mac al compararlas con las células monocíticas (Figuras 5A, 5B). Con base en esta información concluimos que los monocitos se diferenciaron a células con características tipo macrófagos.

7.2 POLARIZACIÓN DE CÉLULAS TIPO MACRÓFAGOS A LOS DIFERENTES FENOTIPOS (INFLAMATORIOS, REGULADORES Y REPARADORES DE TEJIDO)

Para obtener macrófagos con los diferentes fenotipos de interés, las Mac fueron incubadas después de dos días en descanso de PMA con las citocinas correspondientes (IFN- γ , IL-10 ó IL-4) durante 2 días (Figura C1).

No se observaron diferencias entre la morfología de las células tipo macrófagos y las células tratadas con las diferentes citocinas; las subpoblaciones de macrófagos mostraron tamaño y granularidad similares, tanto a la observación al microscopio de campo claro, así como en el análisis por citometría de flujo (Figura 6).

Las Mac polarizadas con los distintos tratamientos también fueron estudiadas mediante citometría de flujo para determinar la expresión de 3 marcadores, los cuales se ha reportado se expresan específicamente en los distintos estados de polarización de los macrófagos (Figura 7). Los marcadores utilizados fueron CD206, el receptor de manosa, conocido marcador de macrófagos reparadores de tejido cuya expresión es inducida en varios modelos de estudio por la citocina IL-4; también se determinó la expresión de CD163, receptor scavenger de complejos hemoglobina-haptoglobina cuya expresión aumentada es

característica de macrófagos reguladores, y CD80, molécula coestimuladora y marcador de macrófagos inflamatorios (M1). La expresión de estos marcadores es muy baja en los monocitos en comparación con los macrófagos (Figura C3) considerándose negativa al no observarse diferencias entre la intensidad media de fluorescencia de células sin teñir y teñidas con anticuerpos específicos para estos marcadores.

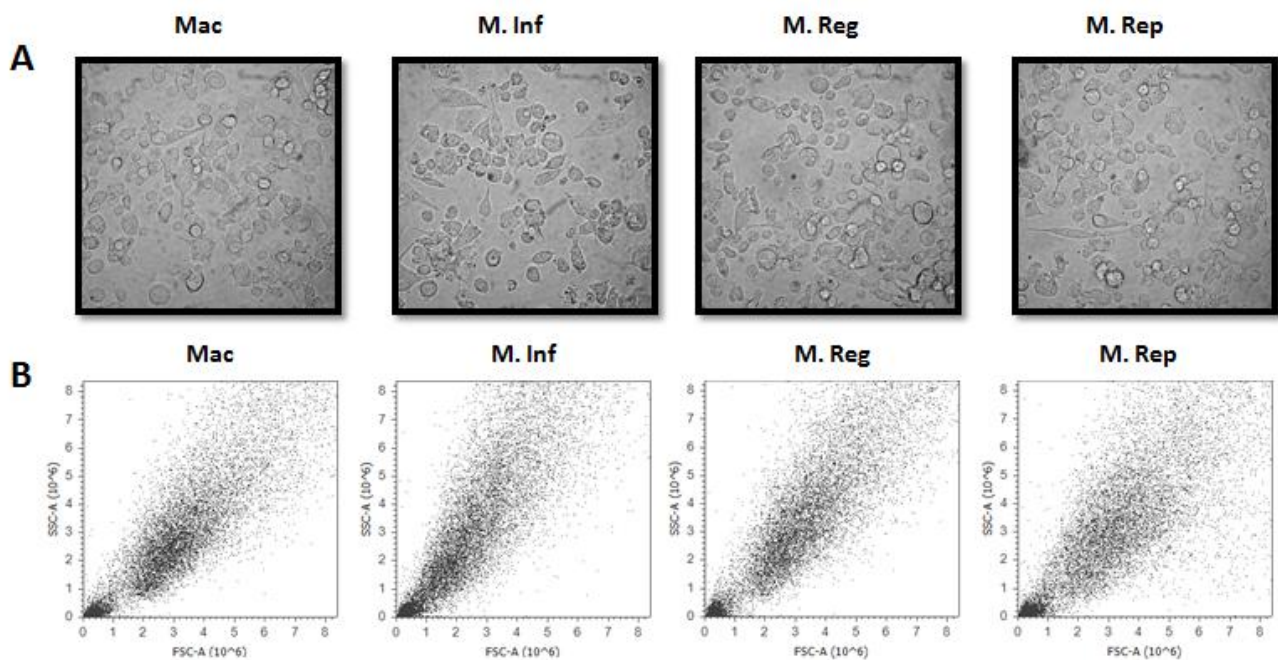


Figura 6. Características morfológicas de diferentes subpoblaciones de macrófagos: inflamatorios, reparadores y regulatorios (A) Fotografías de microscopía óptica 40X del cultivo de las diferentes subpoblaciones de macrófagos, fueron tomadas después de 2 días de tratamiento con las respectivas citocinas: sin citocinas (Mac), con IFN- γ (M.Inf), con IL-10 (M. Reg) o con IL-4 (M. Rep). (B) Gráficos de puntos de granularidad (SSC-A) contra tamaño (FSC-A) de los diferentes grupos de macrófagos obtenidos con cada tratamiento.

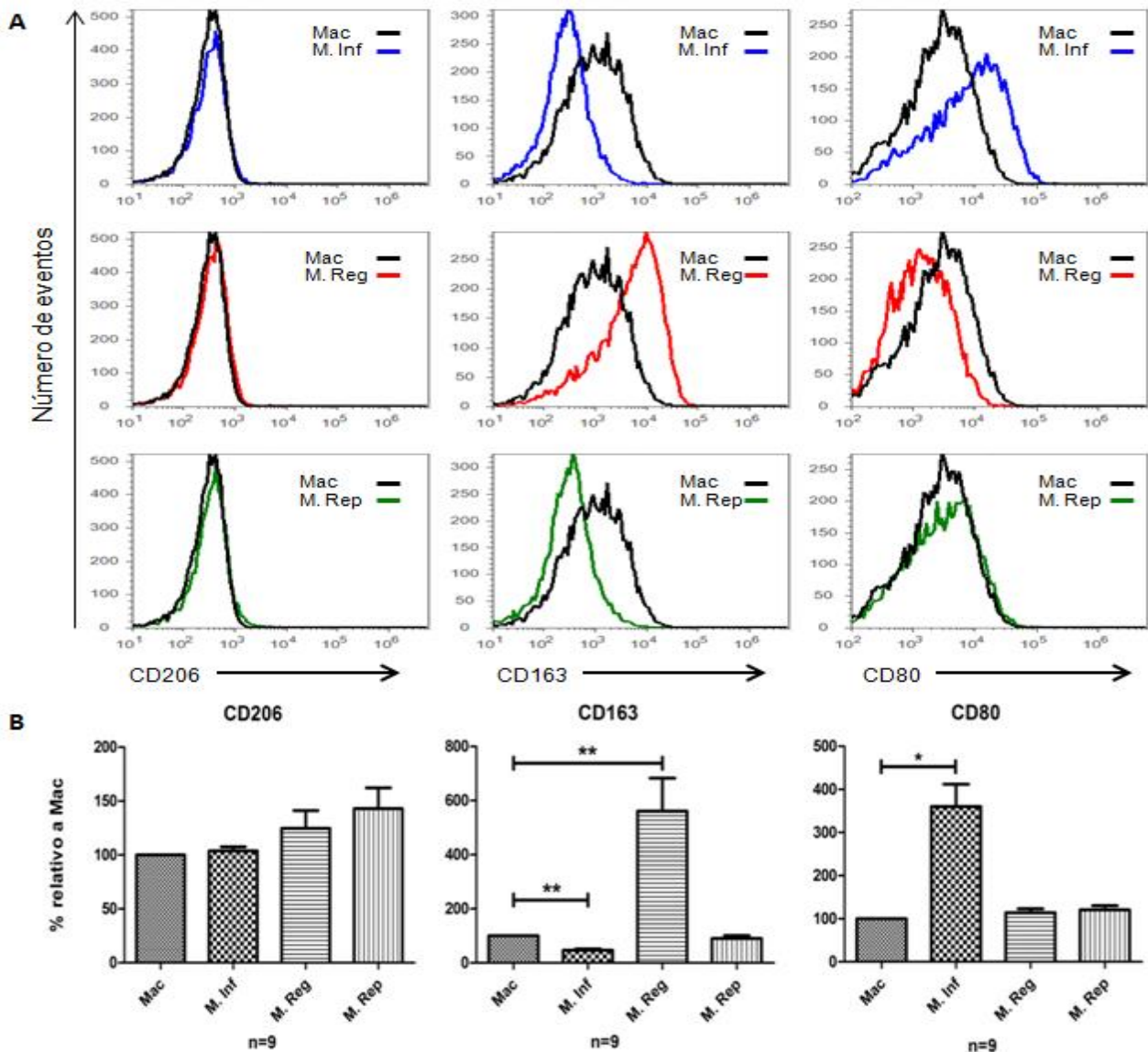


Figura 7. Expresión de marcadores de polarización en las diferentes subpoblaciones de macrófagos. Se evaluó la expresión de CD206, CD163 y CD80 como marcadores de polarización en las células tipo macrófagos con diferentes tratamientos de citocinas. (A) Histogramas representativos de la expresión de los diferentes marcadores de polarización donde la línea negra representa a las células tipo macrófagos sin estímulo (Mac), la línea azul a los macrófagos inflamatorios (M. Inf), la línea roja a los macrófagos reguladores (M. Reg) y la línea verde a los macrófagos reparadores de tejido (M. Rep). (B) Gráficos de barras que representan el promedio del porcentaje relativo (calculado con la IMF) de la expresión de los marcadores de polarización en 9 experimentos independientes, las barras de error representan el EEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ de una prueba t-Student pareada como análisis post-ANOVA.

Los resultados obtenidos muestran que en este modelo de estudio, las Mac tratadas con IFN- γ presentan un fenotipo inflamatorio, observándose un aumento estadísticamente significativo en la expresión de CD80, las células tratadas con IL-10 tuvieron un aumento en la expresión de CD163, adicionalmente se observó que los macrófagos inflamatorios presentaron una disminución significativa de la expresión de este marcador, lo cual también ha sido reportado en la literatura. En cuanto al tratamiento con IL-4, no se observaron diferencias en la expresión de CD206 en comparación con las células control (Mac) ni con los demás tratamientos (Figura 7).

Adicionalmente se determinó la expresión de CD11b en todos los macrófagos polarizados (Figura C2), encontrando que la expresión de este marcador no es modulada por la polarización ya que los niveles de expresión en todas las poblaciones de macrófagos carecen de diferencias significativas entre sí.

7.3 EXPRESIÓN DE CD13 EN LA MEMBRANA CELULAR DE MACRÓFAGOS CON DISTINTOS ESTADOS DE POLARIZACIÓN

Como se mencionó anteriormente, CD13 es una ectopeptidasa de membrana expresada en diferentes tipos de células de distintos tejidos como el epitelio renal e intestinal, también es conocida su expresión en células mieloides como monocitos y macrófagos (Zhang y Xu 2008). Se sabe que en distintas líneas celulares la sobreexpresión de esta molécula es inducida por citocinas como IL-4 ó IFN- γ , debido a esto, en este trabajo se determinó si la expresión de CD13 como proteína de membrana esta modulada por la polarización de los macrófagos, mediante inmunofluorescencia indirecta.

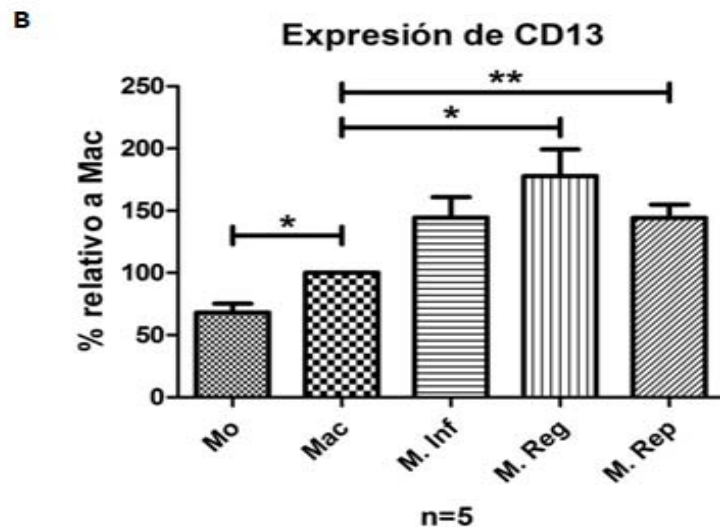
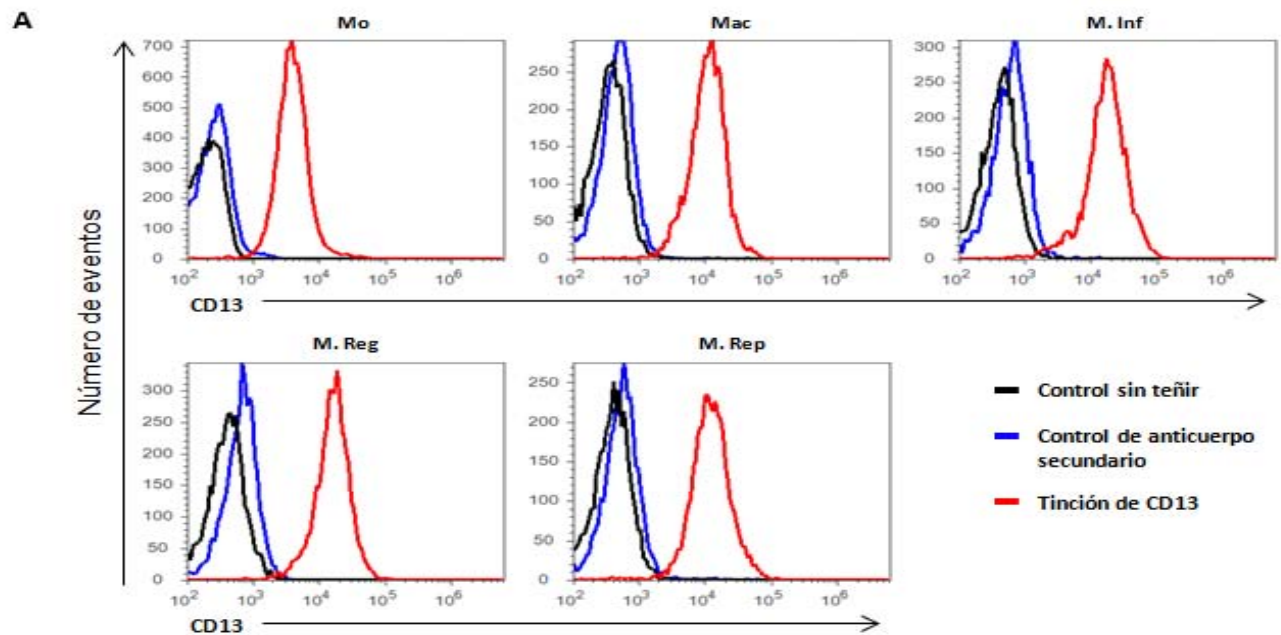


Figura 8. Expresión en membrana de CD13 en monocitos y macrófagos con distintos estados de polarización. Se evaluó la expresión de CD13 como proteína en la membrana celular mediante inmunofluorescencia indirecta. (A) Histogramas representativos donde se observan los diferentes niveles de expresión de CD13 (línea roja) en las diferentes poblaciones celulares estudiadas en comparación con el control sin anticuerpo (línea negra) y el control de anticuerpo secundario (línea azul). (B) Gráfico de barras que representa el promedio de 5 experimentos independientes del porcentaje relativo (calculado con la IMF) de la expresión de CD13 con respecto a los macrófagos sin estímulo (100%). Las barras de error representan el EEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ de una prueba t-Student pareada como análisis post-ANOVA.

Los macrófagos polarizados fueron cosechados después de 2 días de incubación con las citocinas, se cuantificaron y fueron incubados secuencialmente con un anticuerpo monoclonal anti-CD13 (clona 452) y un anticuerpo secundario cabra anti ratón teñido con FITC. Se analizó de cada subpoblación celular un control de células sin anticuerpos, y un control de células incubadas únicamente con el anticuerpo secundario (Figura 8). Los histogramas en los cuales se hace el traslape del control del segundo anticuerpo, muestran que hay una mínima o ausente fluorescencia inespecífica, lo cual tiene relación directa con un pegado inespecífico, ya que la fluorescencia del control de anticuerpo secundario es casi la misma que la de los controles sin teñir. También podemos observar que las poblaciones son homogéneas observándose un solo pico en todos los histogramas.

En lo que corresponde a la modulación de la expresión de CD13 en los macrófagos polarizados (Figura 8B), se graficó el incremento relativo de la expresión de CD13 con respecto a los macrófagos en estadio 0 (Mac), esto para hacer más evidentes las diferencias en la expresión de CD13 de los distintos estados de polarización de los macrófagos comparados con los macrófagos sin polarizar, que es el objetivo de este trabajo. El incremento relativo se calculó restando la fluorescencia (IMF) registrada del control de anticuerpo secundario a la fluorescencia emitida por la unión del anticuerpo secundario al anticuerpo primario (CD13) posteriormente estos resultados fueron normalizados con respecto a la diferencia de la IMF obtenida en los macrófagos 0.

Los resultados muestran que CD13 se encuentra expresado en los monocitos, esta expresión aumenta significativamente en un 50% aproximadamente cuando los monocitos son diferenciados a Mac, este incremento podría indicar la participación de CD13 en el proceso de diferenciación de monocito a macrófago. Tomando en cuenta la expresión en los

macrófagos 0 como el 100%, podemos observar que la expresión de CD13 es modulada por los diferentes tratamientos realizados para polarizar a los macrófagos. Los macrófagos reparadores de tejido aumentaron significativamente su expresión de CD13 casi en un 50%, los macrófagos reguladores presentaron un aumento de aproximadamente el 80% en la expresión de CD13, este aumento fue estadísticamente significativo, en lo que corresponde a los macrófagos inflamatorios se observa en la grafica un aumento de casi un 50% en la expresión de CD13 con respecto a los macrófagos 0, sin embargo solo es una tendencia ya que no se encontró que este incremento fuera estadísticamente significativo.

7.4 EXPRESIÓN DEL RNA MENSAJERO DE CD13 EN MACRÓFAGOS POLARIZADOS

La expresión de una proteína incluye procesos moleculares como la transcripción de genes y la traducción de RNA mensajero a proteína, estos procesos están estrictamente regulados ya sea mediante la activación/inhibición de factores de transcripción, por mecanismos epigenéticos, ó por modificaciones post-transcripcionales, por degradación y estabilidad del mensajero, etc. Está es una de las razones por las cuales la expresión del RNA mensajero de una proteína dada, no siempre es directamente proporcional a su expresión en membrana. Debido a esto, en este trabajo decidimos determinar los niveles de expresión del RNA mensajero de CD13 en los macrófagos con distintos estados de polarización y evaluar la expresión del RNAm en comparación con la proteína en membrana.

Esta determinación se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando el método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) y SYBR Green como sistema de detección. Por lo tanto, fue necesario realizar el cálculo de la eficiencia de la reacción para los oligonucleótidos específicos para CD13 y para el control endógeno (HPRT), así como la validación del

método mediante la gráfica de Delta Ct (ΔCt) contra el logaritmo de la dilución del DNA complementario (Figura C4).

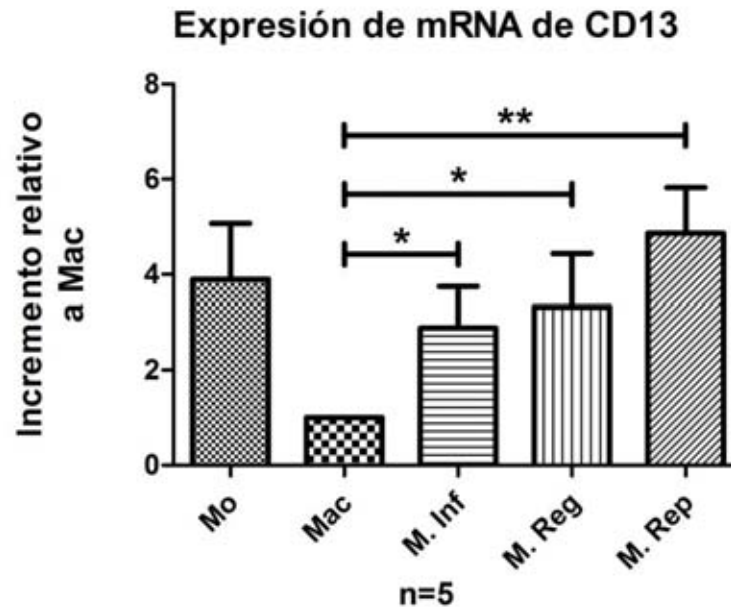


Figura 9. Expresión del RNA mensajero de CD13 en monocitos y macrófagos con distintos estados de polarización. Se evaluó la expresión del mensajero de CD13 mediante RT-PCR, el gráfico de barras representa el promedio del incremento relativo (calculado con el $\Delta\Delta Ct$) de la expresión del mensajero de CD13 de 5 experimentos independientes, las barras de error representan el EEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ de una prueba t-Student pareada como análisis post-ANOVA.

Debido a que el SYBR Green es un compuesto intercalante inespecífico, es importante realizar un proceso de validación para determinar que solo se está generando un producto de amplificación en la reacción y que la fluorescencia obtenida no se debe a productos inespecíficos o dímeros de los oligonucleótidos. Por esta razón, se realizaron ensayos para obtener la curva de disociación de los productos amplificados en las reacciones de RT-PCR, en los cuales se observa un solo producto de amplificación (Figura C5).

Una vez realizados todos los procesos de validación del método, se determinó el incremento relativo en la expresión del mensajero de CD13 en los monocitos y en los macrófagos polarizados con respecto a los macrófagos en estadio 0.

Los resultados (Figura 9) indican que tanto los monocitos como los macrófagos polarizados presentan una mayor expresión del RNA mensajero de CD13, en el caso de los monocitos solo se observa una tendencia ya que este nivel de expresión no es estadísticamente diferente al de los macrófagos 0. En cuanto a los macrófagos polarizados: los macrófagos inflamatorios y reguladores tienen una expresión de aproximadamente 3 veces la expresión de los macrófagos 0 y estos incrementos tienen significancia estadística, también podemos observar que los macrófagos reparadores de tejido son los que presentan un mayor cambio en la expresión siendo casi 5 veces mayor que la expresión en los macrófagos 0, al igual que en los otros fenotipos de macrófagos, este incremento tiene significancia estadística.

Los resultados encontrados mediante PCR en tiempo real para los macrófagos reguladores y reparadores de tejido concuerdan con lo encontrado por citometría de flujo, sin embargo, en el caso de los ensayos de PCR en tiempo real podemos observar que los incrementos en la expresión del mensajero son mucho mayores con respecto a los incrementos en los niveles de proteína que encontramos en estas poblaciones celulares. Estos resultados posiblemente se deban a la degradación parcial del RNA mensajero como un mecanismo de regulación postranscripcional, lo cual, explicaría por qué no se encontró una relación directa entre los niveles de mensajero y de proteína en la membrana. En el caso de los macrófagos inflamatorios encontramos un aumento significativo de la expresión del RNA mensajero de CD13, mientras que no se encontró aumento significativo de la expresión de CD13 en membrana. Adicionalmente se observó que durante la diferenciación de monocito a

macrófago los cambios en la expresión del RNA mensajero y la proteína son opuestos, ya que observamos que la diferenciación disminuye los niveles del mensajero (tendencia) pero aumenta la expresión de la proteína (significancia estadística).

7.5 CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE CD13 EN MACRÓFAGOS POLARIZADOS

CD13 tiene una alta expresión en células monocíticas y macrófagos, las cuales tienen una gran capacidad fagocítica, y se ha demostrado que CD13 es capaz de mediar fagocitosis (Licona-Limón 2015). Se ha reportado además que monocitos que presentan una mayor actividad fagocítica poseen niveles más altos de expresión de CD13 que el resto (Tokuda 1996). Ya que en este trabajo hemos observado que la diferenciación y polarización son procesos que modulan la expresión de CD13, decidimos determinar la capacidad fagocítica de estos macrófagos inducida por la activación de CD13 utilizando la técnica de citometría de flujo.

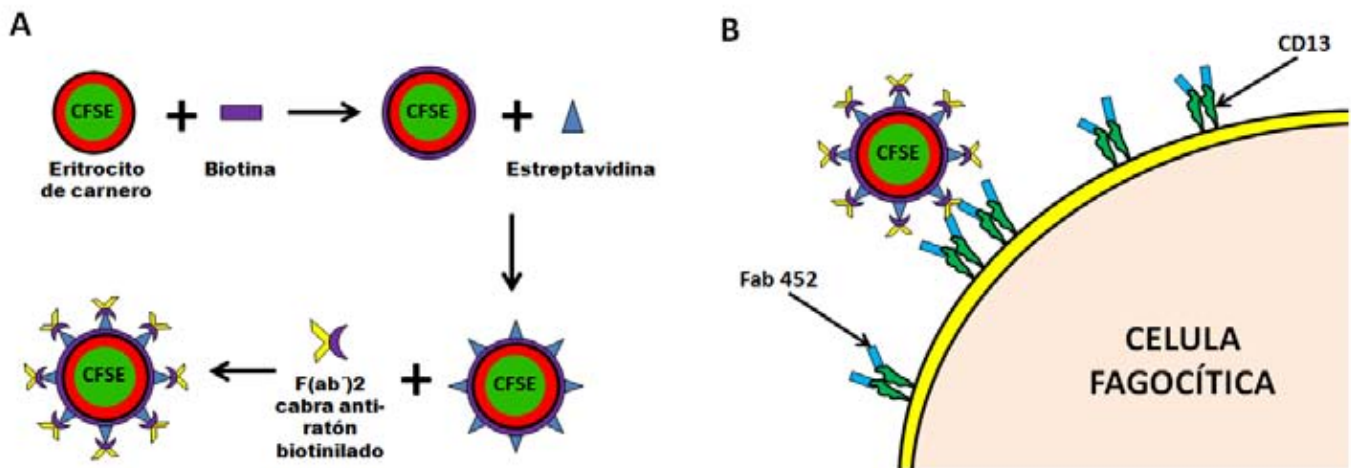


Figura 10. Esquema de la interacción entre célula y partícula en la fagocitosis selectiva a través de CD13. (A) Tratamiento de los eritrocitos de carnero teñidos con CFSE. (B) Interacción del eritrocito de carnero y la célula fagocítica.

Para estos ensayos se utilizaron como partículas para ser fagocitadas, eritrocitos de carnero teñidos con CFSE, los cuales fueron tratados sucesivamente con biotina y estreptavidina para posteriormente incubarlos con fragmentos F(ab)² de anticuerpos anti-Ig de ratón biotinilados. Las células fagocíticas (macrófagos) por su parte fueron tratadas con fragmentos Fab de anticuerpos de ratón anti-CD13 humano, de esta forma, al entrar en contacto con los eritrocitos tratados como se indicó, se entrecruzaría CD13 activando la fagocitosis de la partícula (Figura 10). Después de la fagocitosis, los eritrocitos no fagocitados fueron lisados para que no causaran interferencia en los resultados del ensayo y la fluorescencia intracelular de las células fagocíticas es determinada mediante citometría de flujo y es un indicativo de la fagocitosis de estas células.

A la par de la fagocitosis a través de CD13 se realizó el mismo ensayo con células fagocíticas sin ningún tratamiento (sin Fab anti-CD13 humano) como control negativo, además como control positivo se realizó el mismo ensayo pero activando Fc γ RI, un conocido receptor fagocítico expresado en macrófagos y monocitos (Figura 11). Debido a que la fagocitosis es un proceso totalmente dependiente de la temperatura, también se realizaron exactamente los mismos ensayos de fagocitosis pero a una temperatura de 4°C, lo que observamos fue que efectivamente no hay fagocitosis a esta temperatura (Figura C6).

Las células sin tratamiento así como las que fueron tratadas con los fragmentos anti-CD13 y anti-Fc γ RI fueron analizadas para determinar la unión de los Fabs a las células, para esto, una muestra de cada población celular fue incubada con anticuerpo cabra anti-Ig de ratón conjugado con FITC y analizada por citometría de flujo (Figura C7), los resultados demuestran la unión de los fragmentos Fab a las células, lo cual es de gran importancia para que se logre la interacción con la partícula fagocítica (Figura 10).

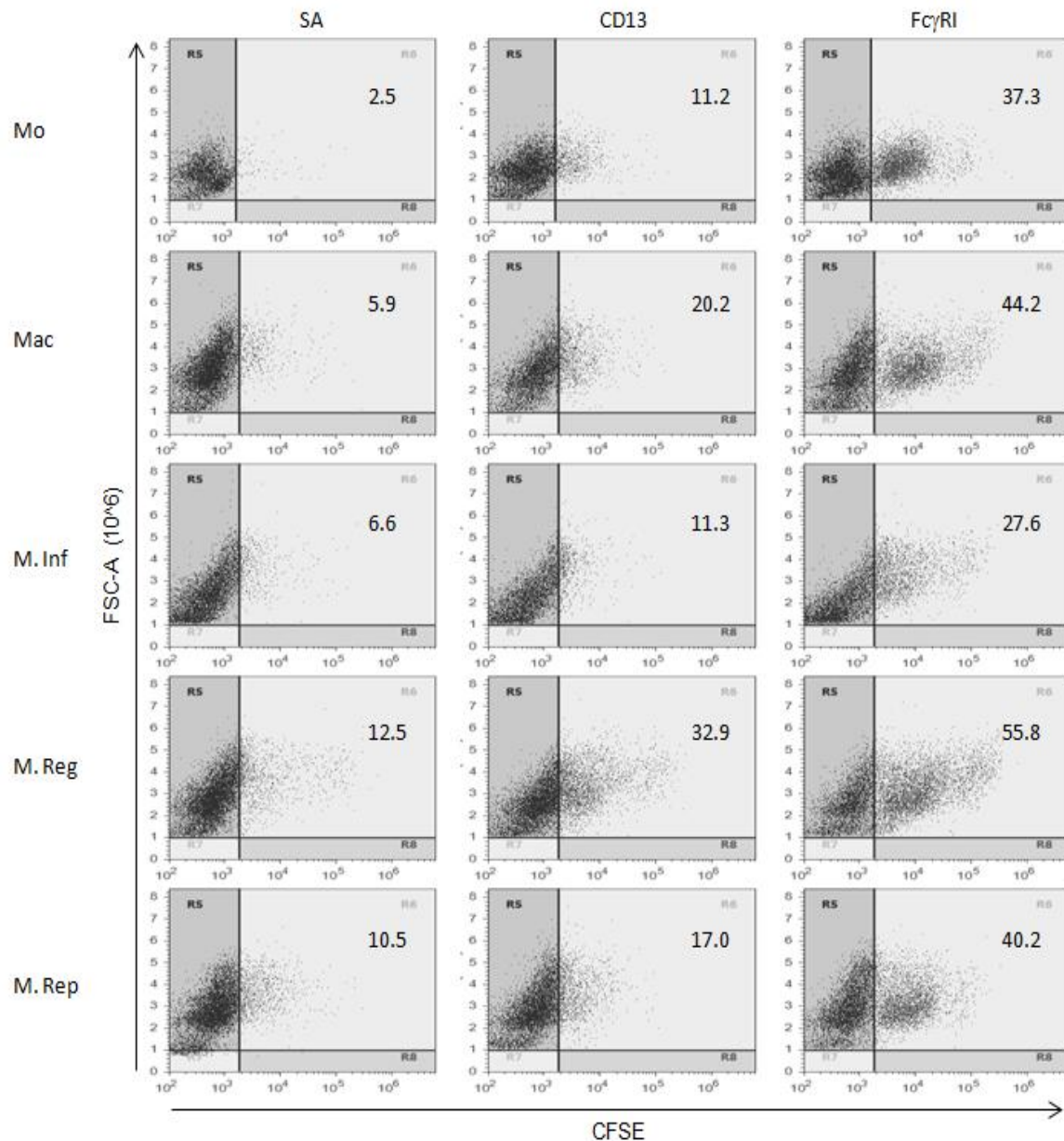


Figura 11. Capacidad fagocítica a través de CD13 en monocitos y macrófagos con distintos estados de polarización. Se evaluó la capacidad fagocítica a través de CD13 en los macrófagos polarizados. Eritrocitos de carnero fueron teñidos con CFSE e incubados sucesivamente con biotina, estreptavidina y fragmentos F(ab) $'$ 2 anti-Ig de ratón biotinilados, posteriormente fueron incubados con macrófagos polarizados sin opsonizar (SA) u opsonizados con Fabs anti-CD13 (clona 452) o anti-Fc γ RI (clona 32.2). En la figura se muestran gráficos de puntos de tamaño contra fluorescencia de un ensayo de fagocitosis representativo a 37°C. Los números en cada gráfico representan el porcentaje de células positivas para la fagocitosis.

En lo que corresponde a la fagocitosis de los macrófagos polarizados a través de CD13 a 37°C se obtuvieron porcentajes de células positivas e intensidades de fluorescencia variables entre los experimentos independientes, sin embargo, siempre se observó en cada uno la misma tendencia: la capacidad fagocítica de los macrófagos 0 se reducía cuando estos eran polarizados al fenotipo inflamatorio y al reparador de tejido, pero se incrementaba con el fenotipo regulador (Figura 11).

Con estos datos construimos gráficos de barras con el promedio de 5 experimentos independientes, reportando tanto el porcentaje de células positivas como el índice fagocítico, que es un parámetro que se obtiene de multiplicar la IMF por el porcentaje de células positivas por lo que es un indicativo del número de eritrocitos que fagocitaron los macrófagos que resultaron positivos para el ensayo.

Al comparar la fagocitosis inducida por CD13 con la fagocitosis inespecífica en los macrófagos polarizados (control negativo) lo que podemos observar en los resultados (Figura 12) es que todas las poblaciones celulares estudiadas con excepción de los macrófagos inflamatorios presentan diferencias significativas en el porcentaje de células positivas al compararlas con el control negativo pero en cuanto al índice fagocítico solo se encontraron diferencias en macrófagos con estadio 0 y en macrófagos reguladores (Figura 12).

Otra observación importante que resalta de estos resultados, es que la fagocitosis basal o inespecífica (control negativo) parece ser mayor en los macrófagos que en los monocitos, esto puede ser debido a la expresión de receptores scavenger en los macrófagos, los que podrían estar mediando la fagocitosis inespecífica de los eritrocitos. Esto también puede

explicar porqué los macrófagos reguladores presentan un incremento en el índice fagocítico basal, ya que esta subpoblación se caracteriza por una mayor expresión de receptores scavenger.

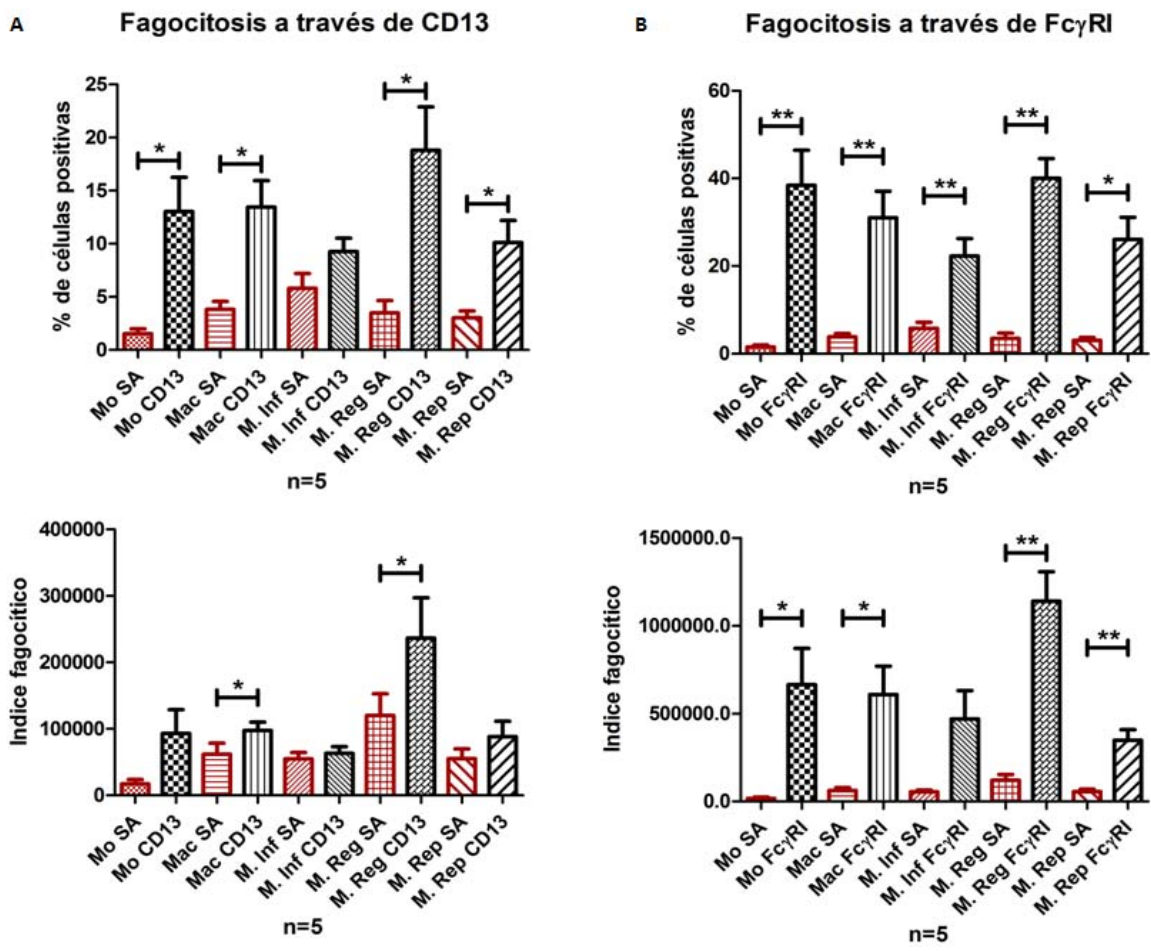


Figura 12. Fagocitosis a través de CD13 y Fc γ RI en monocitos y macrófagos con distintos estados de polarización. Se evaluó la capacidad fagocítica a través de CD13 y Fc γ RI en los macrófagos y se comparó con la fagocitosis producida sin estimular ningún receptor específico (SA). Gráficos de barras que representan la fagocitosis específica a través de (A) CD13 y (B) Fc γ RI en porcentaje de células positivas e índice fagocítico, comparando ambas con la fagocitosis inespecífica producida en esas mismas células (SA). Se graficó el promedio de 5 experimentos independientes, las barras de error representan el EEM, *p<0.05, **p<0.01 de una prueba t-student pareada como análisis post-ANOVA.

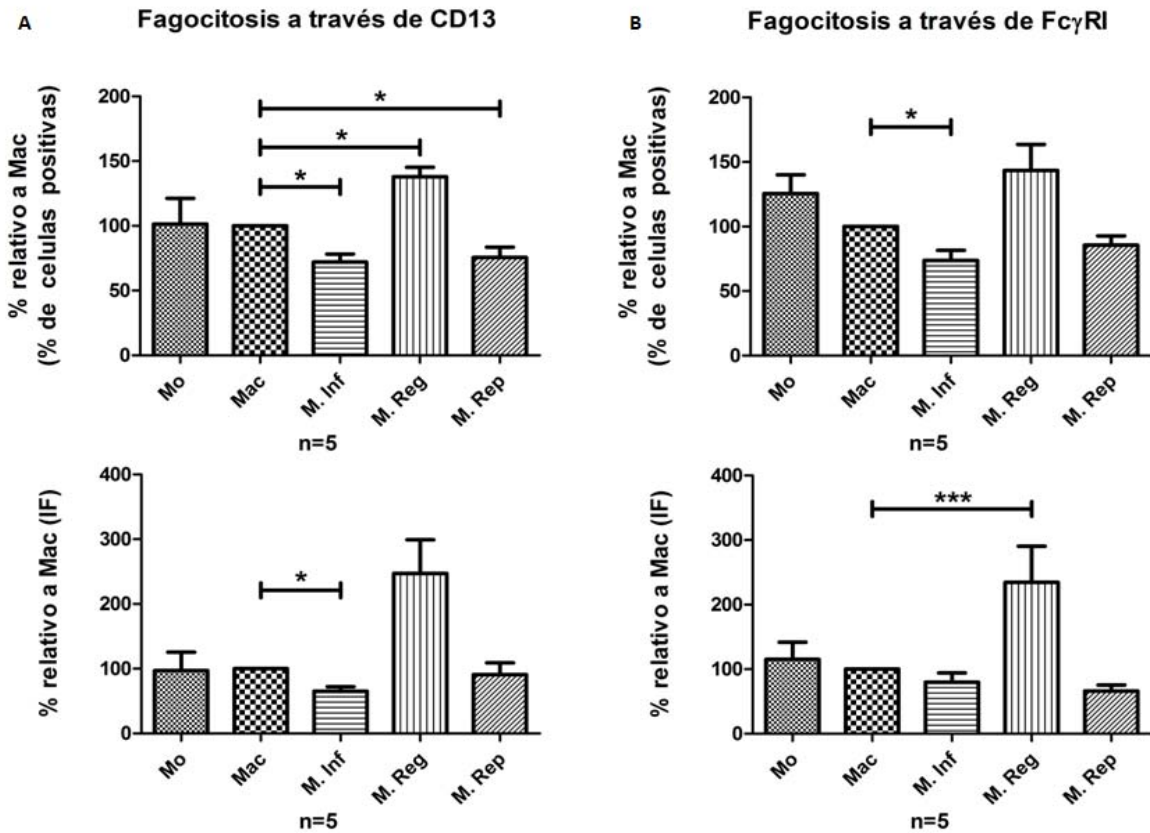


Figura 13. Fagocitosis relativa entrecruzando CD13 ó Fc γ RI en monocitos y macrófagos con distintos estados de polarización. Gráficos de barras que representan la fagocitosis relativa a través de (A) CD13 y (B) Fc γ RI comparando monocitos y macrófagos polarizados con los macrófagos en estadio 0 (Mac) que representan el 100%. Se graficó el promedio de 5 experimentos independientes, las barras de error representan el EEM, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ de una prueba t-student pareada como análisis post-ANOVA.

Posteriormente realizamos un análisis para comparar la fagocitosis inducida en la activación de CD13 en los diferentes grupos de macrófagos polarizados con los macrófagos 0, lo cual es un objetivo de este trabajo (Figura 13). Los macrófagos inflamatorios presentan una disminución de la fagocitosis mediada por CD13, determinada tanto por el porcentaje de células positivas como por el índice fagocítico. Los macrófagos reparadores de tejido

también disminuyen su capacidad fagocítica a diferencia de los macrófagos reguladores cuyo incremento de la fagocitosis a través de CD13 es evidente, sin embargo, en el caso de estos dos últimos grupos de macrófagos solo se observa significancia estadística en los resultados de porcentaje de células positivas. Adicionalmente podemos observar que no hay diferencia en la fagocitosis específica a través de CD13 entre los macrófagos y los monocitos.

Tabla 5. Resumen de los resultados de expresión y fagocitosis de CD13 en monocitos y en las distintas poblaciones de macrófagos polarizados. Los números representan el promedio y la desviación estándar del porcentaje relativo a macrófagos 0 (Mac) de los niveles de expresión y fagocitosis de CD13 en las distintas poblaciones celulares. En rojo se encuentran aquellos en los que se observó significancia estadística.

	Mo	Mac	M. Inf	M. Reg	M. Rep
Expresión de CD13 en membrana celular	68±17	100	145±37	178±48	144±24
Expresión de RNA mensajero de CD13	390±260	100	289±193	332±249	486±214
Fagocitosis a través de CD13 (% CEL)	101±44	100	72±14	138±16	76±18
Fagocitosis a través de CD13 (IF)	97±71	100	65±13	247±127	91±46

8. DISCUSIÓN

Los macrófagos son células de la inmunidad innata que se caracterizan por poseer una gran capacidad fagocítica, son importantes para la defensa del hospedero en la respuesta inmune debido a que llevan a cabo funciones específicas, participan en los procesos inflamatorios contribuyen a la eliminación de patógenos, así como en la reparación de los tejidos y restauración de la homeostasis tisular. Estas células tienen la capacidad de alterar su fenotipo y funcionalidad mediante cambios en la expresión de genes y proteínas, producidos por la perturbación de estas células por agentes externos y diferentes estímulos, lo cual les permite cumplir ciertas funciones de forma más eficiente (Murray 2014).

Para sistematizar la comprensión del papel de los macrófagos en la respuesta inmune se ha propuesto clasificar y caracterizar los estados funcionales de estas células. En un principio se propuso la terminología M1 y M2 para clasificar a los macrófagos basándose principalmente en las citocinas que inducían los cambios fenotípicos en estas células. Esta clasificación proviene de la descripción de los efectos del interferón gamma (IFN- γ) y de la interleucina 4 (IL-4) sobre la expresión de genes (Martínez 2014, Stein 1992) haciendo a la vez una referencia a la subpoblación de linfocitos T cooperadores productora de las respectivas citocinas. Posteriormente la clasificación M2 fue expandida para incluir otras citocinas o estímulos alternativos (M2a, M2b, M2c, etc.), contribuyendo a la idea de que la polarización de los macrófagos se presentaba como un espectro continuo y que no sería fácil clasificarlos en grupos definidos. Mosser y Edwards han sugerido que es más útil clasificar a los macrófagos con base a una o varias funciones que el fenotipo inducido cumple más eficientemente (Edwards 2008).

8.1 DIFERENCIACIÓN Y POLARIZACIÓN

En este trabajo estudiamos 3 principales estados de polarización basados en la clasificación de Mosser y Edwards: macrófagos inflamatorios, macrófagos reguladores de la respuesta inmune y macrófagos reparadores de tejido. Para el estudio de estas subpoblaciones celulares es importante definir el modelo de estudio a utilizar, de modo que presente los la mayor información posible y que sea representativo de lo que ocurre en seres humanos *in vivo*.

Los macrófagos obtenidos por diferenciación de monocitos de sangre periférica es el sistema *in vitro* predominante para estudiar macrófagos humanos (Murray 2014). Este modelo permite el estudio de células humanas, sin embargo, el problema principal en este método es indudablemente la gran variabilidad que presentan las células obtenidas de diferentes donadores. Es imposible controlar estas variaciones debido a que son causadas por factores en diferentes niveles de regulación. La variabilidad intrínseca de los donadores influye en la repetibilidad de los experimentos por lo que complica la obtención de resultados estadísticamente significativos.

El modelo murino representa una alternativa que tiene como ventaja la disminución de la variabilidad entre individuos, además de permitir realizar manipulaciones genéticas en los ratones. En estos modelos, los sistemas de obtención de macrófagos más comúnmente utilizados son mediante lavados peritoneales o diferenciación a partir de células extraídas de medula ósea. Estos sistemas presentan también ciertas desventajas ya que los resultados obtenidos con estos modelos no siempre reflejan lo que ocurre en humanos debido a las diferencias que pueden existir entre especies, como son los diferentes balances entre las

subpoblaciones de leucocitos, expresión de receptores de membrana, moléculas secretadas, componentes de señalización, entre otras, lo que puede ocasionar que respondan de forma diferente a algún estímulo alterando sus distintas funciones (Mestas 2014). En macrófagos, por ejemplo, los marcadores reportados para caracterizar los estados de polarización son distintos entre células humanas y murinas; así por ejemplo, para macrófagos reparadores de tejido, los marcadores principalmente descritos en humanos son los receptores tipo lectinas, mientras que en ratones la expresión de arginasa es aceptada como marcador de esta subpoblación (Murray 2014).

Otra alternativa para realizar estudios *in vitro* de macrófagos son las líneas celulares. Estas células son obtenidas principalmente a partir de células neoplásicas adaptadas al cultivo *in vitro* o por inmortalización de cultivos primarios de células, por lo tanto, pueden presentar diferencias en algunos procesos celulares y un mayor número de mutaciones debido a las alteraciones de su ciclo celular. Sin embargo, estas líneas celulares ofrecen muchas ventajas, la más importante quizá, es la fácil manipulación de estas ya que tienen una tasa de proliferación rápida y facilitan la obtención de material de trabajo. Otra ventaja de estas líneas, es que permiten realizar estudios en células humanas minimizando la variación intrínseca de las células de donadores. Similar a lo que ocurre en modelos murinos, las líneas celulares pueden ser manipuladas genéticamente para inducir sobreexpresión de proteínas o silenciamiento de genes.

Analizando los modelos existentes para la obtención de macrófagos, llegamos a la conclusión de realizar este trabajo utilizando la línea celular THP-1 de monocitos humanos. Esta línea fue obtenida de un paciente con leucemia monocítica aguda, y fue caracterizada como monocito en base a funcionalidad y fenotipo. Los monocitos son precursores

inmediatos de los macrófagos. Para alcanzar el estadio de macrófagos, los monocitos deben pasar por un proceso de diferenciación celular que se define como el proceso a través del cual una célula sufre cambios en la expresión de genes para adquirir las características morfológicas, fenotípicas y funcionales de un tipo celular específico. *In vivo*, los monocitos migran a los tejidos donde se diferencian a macrófagos como resultado de estímulos del microambiente; esta migración de monocitos a tejido mantiene algunas poblaciones de macrófagos residentes. En cultivos primarios de monocitos, los procesos de adherencia inician el proceso de diferenciación, aunque en ciertos estudios se ha reportado que la incubación con citocinas como M-CSF favorece a la diferenciación de los monocitos de sangre periférica a macrófagos (Jaguin 2013). En cuanto a la línea celular THP-1, es necesario inducir el proceso de diferenciación celular *in vitro* debido a que estas células están arrestadas en el estadio de monocitos.

Los principales métodos reportados en la literatura para diferenciar monocitos THP-1 a células tipo macrófagos son mediante la activación con 1,25-dihidroxitamina D3 (VD3) o PMA (Daigneault 2010). En este trabajo los experimentos fueron realizados diferenciando las células THP-1 a macrófagos utilizando PMA, ya que se observó que las células con este tratamiento obtenían características similares a las de los macrófagos (Figura 4). El PMA actúa como un activador de la proteína cinasa C (PKC), la cual a su vez está involucrada en la fosforilación de varias proteínas que intervienen en distintas cascadas de señalización que inducen el proceso de diferenciación celular; sin embargo, si la célula permanece con estas vías de señalización activas esto puede afectar a su capacidad fagocítica, por lo tanto después de una investigación documental implementamos dejar las células 3 días de descanso en medio sin PMA para restaurar el estado basal de las células ya diferenciadas y

asegurar así que estas células tipo macrófagos puedan ser polarizadas con estímulos posteriores a la diferenciación sin perder sus características funcionales.

En los cultivos primarios de monocitos de sangre periférica se ha observado que el proceso de diferenciación a macrófagos induce cambios en la morfología de las células además de aumentos en tamaño, granularidad y adherencia de las células (Daigneault 2010). Esto corresponde con lo que observamos en nuestro modelo de estudio, en el cual, los monocitos tratados con PMA se observan morfológicamente diferentes a los monocitos sin tratamiento; las células modificaron su forma característicamente redonda presentando prolongaciones de membrana como es característico de los macrófagos; también aumentaron en tamaño y granularidad (Figura 4), lo cual corresponde con una célula metabólicamente más activa. Con base en lo anterior, podemos decir que obtuvimos células con características morfológicas similares a los macrófagos obtenidos de cultivos primarios de monocitos de sangre periférica.

Además de la morfología, otro criterio que utilizamos para caracterizar a nuestras células como tipo-macrófagos fue la expresión del marcador CD11b, el cual es una integrina que forma parte del receptor 3 de complemento (CR3) cuya expresión es baja en monocitos como las células THP-1 y aumenta aproximadamente 20 veces después del tratamiento con PMA (Figura 5). Se ha reportado en la literatura que los macrófagos diferenciados a partir de monocitos THP-1 aumentan su expresión de CD11b (Kang 2014) al igual que los macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (Daigneault 2010). Con base en estos resultados, aunados a las características morfológicas que presentan nuestras células, podemos concluir que con nuestro modelo de estudio obtuvimos células con características morfológicas y fenotípicas similares a las de macrófagos humanos.

En los tejidos, los monocitos se diferencian a macrófagos obteniendo características dadas por las condiciones del tejido en el que van a residir, así tenemos células gliales en el tejido cerebral, células de Kupffer en el hígado u osteoclastos en el tejido óseo. En condiciones de homeostasis tisular los macrófagos mantienen un estado general no polarizado (macrófago 0). Por polarización nos referimos, al proceso mediante el cual una célula adquiere características fenotípicas y funcionales que le permiten llevar a cabo procesos específicos de forma más eficiente. Este proceso es inducido en los macrófagos por una gran variedad de estímulos que incluyen entre otros, la presencia de citocinas, bacterias, productos microbianos, glucocorticoides, factores de crecimiento y estimulación a través de receptores. En presencia de daño a los tejidos por agentes patógenos se producen citocinas proinflamatorias como IFN- γ y TNF- α , la primera es secretada por linfocitos Th1 y células NK, mientras que el TNF- α se produce de manera endógena por ligandos de TLRs como el LPS; estos estímulos, por ejemplo, inducen el fenotipo inflamatorio en los macrófagos, lo que los hace más eficientes para eliminar microorganismos patógenos mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. En presencia de otras citocinas como IL-4, IL-13 ó IL-10 se inducen fenotipos alternativos de los macrófagos que contribuyen al control de la inflamación y a la reparación de los tejidos.

Para la obtención de macrófagos polarizados *in vitro* existen distintos protocolos, los más comúnmente utilizados son aquellos en los que se usa IFN- γ solo o en combinación con ligandos de TLRs para inducir el fenotipo inflamatorio, citocinas como IL-4 o en combinación con IL-13 para inducir los fenotipos reparadores de tejido (Kittan 2013, Chanput 2012), mientras que los fenotipos moduladores de la respuesta inmune son inducidos comúnmente por la citocina antiinflamatoria IL-10, aunque también se ha reportado que otros estímulos

entre ellos glucocorticoides, prostaglandinas y complejos inmunes pueden generar fenotipos como este en los macrófagos (Edwards 2008). Se ha descrito en la literatura que la diferenciación de monocitos inducida por la incubación con GM-CSF ó M-CSF puede inducir la polarización a macrófagos inflamatorios o reparadores respectivamente (Kittan 2013); sin embargo, este método presenta muchas desventajas ya que el GM-CSF también se utiliza para diferenciar monocitos a células dendríticas por lo que es posible obtener de esta diferenciación un número sustancial de células CD11c⁺ (Murray 2014). Por estas razones, sigue siendo mejor aceptado que la polarización debe realizarse como un proceso posterior a la diferenciación a macrófagos obteniendo primero macrófagos con un fenotipo general no polarizado (estadio 0), para posteriormente inducir los diferentes estadios con citocinas específicas (Murray 2014).

En nuestro laboratorio, una vez obtenidas células tipo macrófagos en estadio 0, procedimos a incubar las células con las distintas citocinas durante 48 horas para inducir los distintos fenotipos polarizados. Usamos IFN- γ a una concentración de 30 ng/mL para inducir el fenotipo inflamatorio en los macrófagos, e interleucina 10 (20 ng/mL) y 4 (40 ng/mL) para obtener macrófagos reguladores y reparadores de tejido respectivamente. Los distintos tratamientos no indujeron ningún cambio morfológico diferente al observado para los macrófagos 0, que fuera apreciable mediante microscopia óptica (Figura 6). El único cambio apreciable durante el cultivo de las células fue el aumento en la adherencia de las células tratadas con IFN- γ . Para corroborar que el proceso de polarización se llevó a cabo de acuerdo a lo esperado, determinamos la expresión de diferentes marcadores de membrana específicos para cada uno de los fenotipos de interés.

Mediante inmunofluorescencia directa determinamos en todas las poblaciones de macrófagos generados, incluyendo a los macrófagos sin estímulo (estadio 0), la expresión de CD80, una molécula coestimuladora que se ha descrito como un marcador de macrófagos inflamatorios en humanos. En nuestro sistema experimental, encontramos que ninguna de las poblaciones de macrófagos es negativa para la expresión de CD80, todas muestran un aumento significativo en la expresión de este marcador cuando se comparan con la expresión en monocitos (Figura C3); sin embargo, en los macrófagos tratados con IFN- γ se observa un desplazamiento en la fluorescencia emitida por la expresión de CD80 que no se observa en las demás subpoblaciones de macrófagos (Figura 7A). Este aumento en la intensidad de fluorescencia de las células es estadísticamente significativo (Figura 7B), por lo tanto, podemos concluir que estos macrófagos tienen un fenotipo inflamatorio ya que después de ser incubados con una citocina proinflamatoria presentan un aumento en la expresión de un marcador reportado como específico de este fenotipo en células humanas.

Otro marcador utilizado para caracterizar los estados de polarización de los macrófagos fue CD163, un receptor basura (scavenger) que está involucrado en el aclaramiento de hemoglobina y en la regulación inmune (Van den Heuvel 1999). Se ha reportado en otros modelos de estudio que la expresión de este receptor es inducida en macrófagos por IL-10 (Reinartz 2014, Graversen 2002), y se ha observado que macrófagos residentes de algunos tejidos como el testicular (donde la respuesta inmune está altamente regulada), expresan CD163 y presentan un fenotipo inmunosupresor, ya que producen IL-10 de forma constitutiva y son inductores pobres de la proliferación de células T (Winnall 2013). Nosotros observamos que el proceso de diferenciación de monocito a macrófago produce un aumento de casi 20 veces en la expresión de CD163 (Figura C3), este incremento en los macrófagos

puede explicarse debido a que una de las funciones de los macrófagos independientemente de su estado de polarización es la eliminación de células muertas, para lo cual es de gran importancia la participación de receptores scavenger. La expresión de CD163 de los macrófagos 0 se incrementa posteriormente por la polarización con IL-10 (Figura 7), los macrófagos tratados con esta citocina aumentan aproximadamente 6 veces la expresión de este receptor en comparación con los macrófagos 0. Adicionalmente, observamos una disminución de poco más del 50 % en la expresión de este receptor en los macrófagos inflamatorios, aunque los niveles de expresión de CD163 en estos macrófagos con el fenotipo inflamatorio siguen siendo positivos cuando se comparan con la expresión en monocitos. En cuanto a los macrófagos tratados con IL-4, parece que la expresión de este receptor no tiene cambios estadísticamente significativos en comparación con los macrófagos 0. Con base en los resultados que indican que los macrófagos tratados con IL-10 presentan un aumento específico en la expresión de CD163 que no se observa en el resto de las poblaciones de macrófagos podemos concluir que nuestros macrófagos adquirieron un fenotipo regulador. Además de esto, los cambios observados en CD163 en los macrófagos inflamatorios nos indican que el comportamiento de las células de nuestro modelo es similar a lo que ocurre en otros modelos de estudio, donde se ha observado que las citocinas proinflamatorias regulan a la baja la expresión de CD163 (Buechler 2000).

Hasta el momento podemos decir que en los macrófagos tratados con IFN- γ y con IL-10 el proceso de polarización se llevó a cabo correctamente; sin embargo, como se puede observar en la sección de resultados, la expresión de CD206, marcador seleccionado para caracterizar a los macrófagos reparadores de tejido, si bien aumenta durante el proceso de diferenciación (Figura C3), parece no tener ningún cambio en las diferentes subpoblaciones

de macrófagos polarizados (Figura 7). Este marcador fue uno de los primeros marcadores descrito para este fenotipo de macrófagos, ya que ha sido reportado que su expresión es inducida por la presencia de IL-4, principal citocina caracterizada por inducir fenotipos reparadores de tejido en los macrófagos humanos, razón por la que se tomó la decisión de usar este marcador. Existen estudios donde se ha reportado que la expresión de CD206 no logra discriminar entre poblaciones de macrófagos M1 y M2 cuando son polarizados con citocinas (Jaguin 2013). Daigneault y su grupo observaron que macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica en contacto con *S. pneumoniae* incrementan los niveles de expresión de CD206, pero no encontraron lo mismo en macrófagos diferenciados a partir de células THP-1 (Daigneault 2010), por lo cual proponen que se requieren de estímulos adicionales para inducir la expresión de CD206. Esto nos hace pensar que tal vez sea conveniente omitir a CD206 como marcador de macrófagos reparadores en este modelo de estudio, optando por probar otros marcadores que se han utilizado en modelos humanos como DC-SIGN ó dectina-1 (Cassol 2009, Laurant 2012, Chanput 2013). Aunque no logramos encontrar un marcador adecuado en este modelo para identificar el fenotipo reparador, decidimos incluir la población de macrófagos tratados con IL-4 en el estudio, para determinar si su comportamiento era diferente al de los otros fenotipos de macrófagos polarizados.

8.2 EXPRESIÓN DE CD13 EN MACRÓFAGOS POLARIZADOS

Después de la caracterización de nuestro modelo de diferenciación y polarización, nos dimos a la tarea de determinar la expresión de CD13 en las distintas poblaciones de macrófagos obtenidas. Determinamos a la par la expresión de la proteína en membrana y la expresión del RNA mensajero de CD13.

Utilizamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta para determinar la expresión en membrana celular, usando un anticuerpo anti-CD13 (clona 452) como anticuerpo primario y un anticuerpo producido en cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con FITC como anticuerpo secundario. La expresión del RNA mensajero fue determinada mediante la técnica de PCR tiempo real. Nuestros resultados muestran que el proceso de diferenciación celular de monocito a macrófago induce un aumento significativo de la expresión en membrana celular de CD13 (Figura 8). Se ha reportado que CD13 es expresado de forma diferente en distintos estadios de diferenciación celular tanto en células normales como en células neoplásicas (Mina-Osorio 2008), también se ha observado que su expresión es regulada por diferentes agentes de diferenciación como esteroides de forbol y citocinas (Kehlen 2004), por lo que se ha sugerido su participación en el proceso de diferenciación.

Es posible que el aumento en CD13 en la membrana de macrófagos, se deba a su participación en distintos procesos que ayuden a estas células a cumplir con sus funciones de forma más eficiente. Los macrófagos son células con mayor adherencia y capacidad fagocítica que los monocitos; y CD13 ha sido implicada en los procesos de adhesión y también ha sido caracterizado en nuestro grupo de trabajo como un receptor fagocítico. Durante la fagocitosis a través de CD13 se demostró la activación de vías de señalización, con lo cual podemos inferir que el aumento en la expresión en membrana celular sea mayor en macrófagos los cuales son metabólicamente y funcionalmente más activos que los monocitos. Además CD13 también ha sido asociada con presentación de antígeno y quimiotaxis, funciones características de estas células (Mina-Osorio 2008).

En cuanto a la expresión de RNA mensajero para CD13 en la diferenciación (Figura 9), los resultados no concuerdan completamente con lo encontrado en membrana celular; se

observa una tendencia (no estadísticamente significativa) que indica que la expresión del mensajero de CD13 es mayor en monocitos que en macrófagos. Estos resultados pueden tener varias explicaciones, una de ellas incluye que haya diferencias en los procesos de regulación post-transcripcional entre ambos tipos celulares o bien un decremento en la estabilidad del RNA en los macrófagos.

Nuestros resultados también indican que la expresión de CD13 es sobrerregulada durante la polarización de los macrófagos, tanto la expresión a nivel de proteína en membrana como de mensajero. Los macrófagos inflamatorios presentan un aumento no significativo de casi un 50% en la expresión de CD13 en membrana y un aumento de casi 3 veces la expresión del mensajero en comparación con los macrófagos 0 (Figura 8 y 9). Se han reportado en la literatura diferentes trabajos donde se estudia el efecto de citocinas proinflamatorias en la expresión y actividad enzimática de CD13. Así por ejemplo, se ha descrito en células epiteliales tubulares de riñón que la expresión de CD13 es incrementada al tratar las células con IFN- γ (Kehlen 1998) y en células J774 (línea celular de macrófagos murinos) se encontró que IFN- γ incrementa la actividad enzimática de CD13 así como su expresión tanto a nivel de mensajero como de proteína, y que la sobrerregulación del mensajero se debe a activación transcripcional por el interferón y no a un incremento en la estabilidad del RNA (Gabrilovac 2010). Nuestros resultados, utilizando el modelo de macrófagos derivados de THP-1 concuerdan con el comportamiento de CD13 reportado en la literatura para células monocíticas y epiteliales. Como mencionamos anteriormente, también se ha sugerido que CD13 participa en la presentación de antígeno en macrófagos mediante el procesamiento de péptidos antigénicos (Mina-Osorio 2008). Además se ha observado en líneas celulares de macrófagos murinos que en paralelo al aumento de la expresión de CD13, estos macrófagos

incrementan la expresión de moléculas de MHC-II y de moléculas coestimuladoras como CD86 (Gabrilovac 2010), lo cual les permitiría llevar a cabo de forma más eficiente la presentación de antígeno, una función que sería de mayor utilidad en el fenotipo inflamatorio de los macrófagos.

En el modelo utilizado, los macrófagos reguladores, por otro lado, son el fenotipo que presenta un mayor incremento en la expresión de CD13 a nivel de membrana celular (70% aproximadamente) (Figura 8) y también presentan un aumento de 3.5 veces la expresión del mensajero de CD13 en comparación con los macrófagos 0 (Figura 9). No hay muchos reportes acerca de los efectos de IL-10 en la modulación de CD13 pero se ha observado que citocinas antiinflamatorias como TGF- β 1 modulan positivamente la expresión de CD13 en células mielomonocíticas HL-60 tanto a nivel de proteína como de mensajero (Gabrilovac 2008), además, también se ha observado en el mismo modelo de estudio utilizado para este trabajo que IL-10 induce incrementos en la expresión del receptor Fc γ RII (Rivera 2013) y en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica que esta citocina aumenta la expresión de todas las clases de Fc γ Rs con excepción del Fc γ RIIIa. Esta información nos indica que IL-10 podría inducir una sobreexpresión no solo de receptores scavenger y CD13 sino de otros receptores del sistema inmune. Los macrófagos reguladores se caracterizan por tener un fenotipo inmunosupresor, aunado a esto CD13 también ha sido asociado con la regulación de respuestas inmunes, principalmente porque se ha observado su sobreexpresión inducida por citocinas como TGF- β e IL-4. Lo que hemos sugerido es que el incremento en la expresión en membrana celular de CD13 es un mecanismo indirecto para modular la acción de citocinas proinflamatorias mediante su actividad enzimática, como se ha observado con IL-1 α e IL-1 β (Hoffman 1993).

En cuanto a la polarización con IL-4, lo descrito en la literatura indica que esta citocina induce aumentos en la expresión de CD13 en monocitos de sangre periférica, en macrófagos alveolares y en células endoteliales pero no en líneas celulares monocíticas como U-937 o THP-1 (Van Hal 1992 y 1994). En nuestro trabajo, no logramos encontrar un marcador adecuado para diferenciar el fenotipo reparador de tejido, pero a pesar de esto nuestros resultados demuestran que el tratamiento con IL-4 induce cambios en la expresión de CD13, la expresión en membrana se incrementa en un 50% aproximadamente (Figura 8), y la expresión del RNA mensajero por otro lado aumenta casi 5 veces con relación a los macrófagos 0 (Figura 9); estos cambios son estadísticamente significativos y nos indican que los macrófagos están siendo afectados por la presencia de IL-4. Esta subpoblación de macrófagos tratados con IL-4 contribuye a la reparación de tejidos y se caracterizan por la producción de componentes de matriz extracelular y de factores que inducen fibrosis y angiogénesis, procesos necesarios para la reparación de tejido dañado (Biswas 2012). Las peptidasas extracelulares participan también en el proceso de angiogénesis mediante la degradación de componentes de matriz extracelular y generación de péptidos angiogénicos (Bauvois 2004), y CD13 no es la excepción. Por lo tanto los incrementos de CD13 en esta subpoblación de macrófagos podrían estar contribuyendo con esta función específica en este fenotipo de macrófagos.

Aunque los macrófagos que tienen fenotipos reparadores o inmunosupresores son de gran importancia para la resolución de la inflamación, también representan una complicación en ciertas patologías, como en cáncer. CD13 ha sido caracterizado como un marcador de células en distintos tipos de neoplasias, incluso se ha sugerido como un blanco en terapias contra esta enfermedad debido a su participación en procesos como proliferación, invasión

de células tumorales y angiogénesis (Wickstrom 2011). En el caso de los macrófagos asociados a tumores (TAM), estos han sido caracterizados con fenotipos reguladores que contribuyen a la proliferación de células tumorales debido a sus características inmunosupresoras y angiogénicas (Biswas 2012). En este trabajo encontramos que estas subpoblaciones de macrófagos sobreexpresan CD13, lo cual nos permite sugerir que CD13 está participando en procesos de angiogénesis, adhesión celular y regulación inmune específicamente en estos TAMs los cuales podrían estar interactuando con otras células tumorales a través de CD13.

8.3 FAGOCITOSIS A TRAVÉS DE CD13 EN MACRÓFAGOS POLARIZADOS

Una vez determinados los niveles de expresión de CD13 en estas poblaciones celulares, decidimos realizar un estudio para determinar si los incrementos en la expresión de esta molécula inducidos por los estados de polarización se correlacionan con alguna función fundamental de los macrófagos, y en la cual podría participar CD13. Una de las funciones más importantes de estas células y a la que deben su nombre, es la fagocitosis; este proceso es mediado por distintos receptores, por ejemplo, los receptores para la fracción cristalizante de la inmunoglobulina G (Fc γ Rs), receptores scavenger, receptores tipo lectinas, receptores de complemento y algunas integrinas (Stuart 2005). En nuestro grupo de trabajo se ha caracterizado a CD13 como un receptor fagocítico: se describió primeramente que CD13 tiene una asociación funcional con los Fc γ Rs, ya que durante la fagocitosis mediada por estos receptores, CD13 se redistribuye en la copa fagocítica y es internalizado en los fagosomas. Además, se observó que cuando las partículas fagocíticas interactúan simultáneamente con CD13 y Fc γ RI se obtiene una fagocitosis más eficiente que cuando solo interactúa el Fc γ RI (Mina-Osorio 2005). También se le ha asociado con la fagocitosis a

través de otros receptores de la inmunidad innata, ya que se ha observado que entrecruzar CD13 modula positivamente la fagocitosis a través de Dectina-1, uno de los receptores más conocidos para zymosan. También se ha reportado que CD13 contribuye a la fagocitosis de *E. coli* para la cual varios receptores han sido asociados incluyendo C5aR y CD14 (Villaseñor-Cardoso 2013). A pesar de que no se conoce un ligando natural para CD13, se sugirió que esta molécula es capaz de inducir fagocitosis por sí mismo al entrecruzarse con anticuerpos monoclonales en células monocíticas THP-1 y en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica (Licon-Limón 2015). Con base a lo anterior, apoyado con nuestros resultados, los cuales muestran que CD13 es expresado de forma diferencial en macrófagos y en sus distintos estados de polarización, decidimos evaluar la capacidad fagocítica mediada por CD13 en estas subpoblaciones de macrófagos para observar si los niveles de fagocitosis se correlacionan con los niveles de expresión del receptor.

Para realizar estos ensayos utilizamos una técnica que permite que la partícula fagocítica interactúe únicamente con un receptor específico. Haciendo uso del sistema biotina-estreptavidina, recubrimos eritrocitos de carnero teñidos con CFSE con fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo cabra anti-Ig de ratón. Las células fagocíticas por otro lado fueron tratadas con fragmentos Fab de anticuerpos de ratón antihumano específicos contra el receptor de interés, de este modo al entrar en contacto con la partícula fagocítica se llevara a cabo el entrecruzamiento únicamente de este receptor (Figura 10). Como control positivo, a la par de los ensayos de fagocitosis a través de CD13 realizamos el mismo ensayo con un conocido y caracterizado receptor fagocítico (FcγRI) y como un control negativo, células fagocíticas que no fueron tratadas con ningún fragmento de anticuerpo (SA). Para el análisis de los resultados tomamos en cuenta dos parámetros a determinar, el porcentaje de células

positivas para CFSE, que nos indica el número de células que están fagocitando en relación a la población total (cuantas células fagocitaron), el otro parámetro que determinamos fue el índice fagocítico que es calculado mediante el producto del porcentaje de células positivas por la IMF emitida por esta población celular, de este modo este parámetro toma en cuenta también el nivel de fagocitosis de las células que resultaron positivas (cuanto fagocitaron las células).

Nuestros resultados muestran una tendencia de menor fagocitosis a través de CD13 en comparación con el Fc γ RI, mientras con CD13 se alcanzan se alcanzan índices fagocíticos en los macrófagos 0 de 10^5 , a través de Fc γ RI observamos valores más de 5 veces mayores en la misma población (Figura 12).

A la par de la fagocitosis de los macrófagos también determinamos la fagocitosis en los monocitos para ver su comportamiento; encontramos que tanto en monocitos como en macrófagos hay fagocitosis a través de Fc γ RI lo cual se puede apreciar en el porcentaje de células positivas; en cuanto al índice fagocítico únicamente los macrófagos inflamatorios carecen de significancia estadística en comparación con el control negativo, esto nos indica que a pesar de que hay un aumento en el número de células que están fagocitando, estas no fagocitan lo suficiente como para observar una diferencia con las células control. Con CD13, por otro lado, el porcentaje de células positivas es estadísticamente significativo con respecto al control, tanto en monocitos como en macrófagos 0, reguladores y reparadores; el índice fagocítico indica que únicamente se encuentran diferencias en los macrófagos 0 y en los reguladores. Los macrófagos inflamatorios no presentan diferencias en ninguno de los dos parámetros analizados, lo anterior demuestra que en esta población no hay una fagocitosis importante a través de CD13.

Los controles negativos también tienen un comportamiento distinto entre macrófagos y monocitos. La elección de este control negativo, en el cual las células no fagocitan a través de un receptor específico seleccionado mediante fragmentos Fab, determina que no hay fagocitosis inespecífica por parte de las células; a pesar de que nuestros controles negativos tienen porcentajes de fagocitosis inespecífica menores al 6%, se puede observar que estos niveles son mucho más bajos en los monocitos donde se observan porcentajes entre el 1 y 2% (Figura 12). Uno de los requisitos para realizar los ensayos fue que la viabilidad de las células fuera mayor al 90%, por lo que las diferencias entre grupos en la fagocitosis inespecífica pueden deberse al hecho de que los macrófagos son células que están asociadas al aclaramiento de eritrocitos como un proceso para mantener la homeostasis del organismo (Edwards 2008). Adicional a esto, el tratamiento realizado a los eritrocitos desde la tinción con CFSE hasta el recubrimiento con los fragmentos biotinilados puede maltratarlos, por lo que es posible que sean fagocitados a través de otros receptores, como scavenger.

Después de verificar que las células fagocitan a través de CD13, utilizamos los datos para realizar comparaciones entre las diferentes poblaciones de macrófagos y monocitos. A pesar de que los macrófagos son reconocidos por ser más fagocíticos que los monocitos, nosotros observamos que no hay diferencias significativas entre monocitos y macrófagos 0 en cuanto a la fagocitosis por CD13. Incluso la fagocitosis a través de Fc γ RI muestra una tendencia que indica que los monocitos son más eficientes para fagocitar que los macrófagos. Este resultado puede ser explicado por la metodología misma, mientras que los macrófagos son células adherentes, los monocitos THP-1 se cultivan en suspensión, en el momento de despegar los macrófagos de la placa estos tienen que ser incubados con EDTA frío durante

5 minutos y despegados mecánicamente mediante pipeteo, los monocitos por otro lado no requieren de este tratamiento por lo que es probable que se encuentren en condiciones más optimas que los macrófagos al momento de la fagocitosis. A pesar de esto, nuestros resultados muestran que los macrófagos 0 son igualmente eficientes para fagocitar que los monocitos a través de ambos receptores.

La polarización al estado inflamatorio presenta una disminución en el porcentaje de fagocitosis inducido por ambos receptores en comparación con los macrófagos 0 (cerca del 28%); el índice fagocítico por su parte solo presenta una disminución significativa de aproximadamente 35% a través de CD13. Aunque se observa también una disminución de este parámetro en la fagocitosis mediada por $Fc\gamma RI$, estos resultados carecen de significancia estadística (Figura 13). Esta información indica que la polarización a macrófagos inflamatorios disminuye la capacidad de las células para fagocitar. Los macrófagos reparadores de tejido también presentan un decremento en el porcentaje de células positivas en fagocitosis a través de CD13 pero en cuanto al índice fagocítico de estos macrófagos reparadores parece que la capacidad fagocítica de estas células no es diferente respecto a los macrófagos 0. El fenotipo regulador presenta la mayor actividad fagocítica a través de CD13, IL-10 induce un aumento estadísticamente significativo en el número de células positivas para CFSE, y a pesar de no observar diferencias significativas en índice fagocítico se observa claramente un incremento en la capacidad fagocítica de CD13 en estos macrófagos (Figura 13).

Ya ha sido reportado por nuestro grupo de trabajo que la fagocitosis a través de $Fc\gamma Rs$ en macrófagos derivados de monocitos es inhibida posterior al tratamiento con $IFN-\gamma$ y aumenta después del tratamiento de las células con IL-10. También se ha descrito que la menor

capacidad fagocítica de células tratadas con IFN- γ no correlaciona con los niveles de expresión de los receptores Fc en los macrófagos, ya que el IFN- γ incrementa la expresión del Fc γ RI. En el caso de IL-10 los niveles de expresión de receptores si se correlacionan con la capacidad fagocítica, ya que esta citocina induce un aumento en la expresión de todos los Fc γ Rs con excepción del Fc γ RIIa (Frausto del Rio 2012). El efecto negativo de IFN- γ en la fagocitosis se atribuye a que esta citocina aumenta los niveles basales de actina polimerizada en la célula, lo cual impide que la célula responda eficientemente a estímulos adicionales que requieran del rearrreglo del citoesqueleto de actina. Por otro lado, con IL-10 los niveles de actina polimerizada se mantienen bajos lo que permite que la maquinaria celular esté disponible para los rearrreglos del citoesqueleto necesarios para la fagocitosis (Frausto del Rio 2012).

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la capacidad de CD13 de mediar fagocitosis en macrófagos en los distintos estados de polarización, así como correlacionarlo con los niveles de expresión de la proteína y el mensajero de dicha molécula. De forma similar a lo encontrado en la fagocitosis a través de Fc γ Rs, nuestros resultados sugieren que la capacidad fagocítica mediada por CD13 de las células en distintos estados de polarización es independiente de la expresión del receptor, ya que como mencionamos anteriormente la expresión del mensajero de CD13 está aumentada en todas las poblaciones de macrófagos polarizados y la expresión en proteína incrementa solo en macrófagos reguladores y reparadores. Por lo tanto, solo en los macrófagos reguladores el aumento de la fagocitosis por CD13 se correlaciona con la regulación positiva de la expresión de este a diferentes niveles. En el caso de los macrófagos inflamatorios se observa una sobrerregulación del mensajero aunque a nivel de proteína no se observa un aumento estadísticamente

significativo. A pesar de esto, la capacidad fagocítica de CD13 es menor en estos macrófagos, lo cual nos permite sugerir que de forma similar a lo que se observó en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, estos resultados se deban a incrementos de la activación de Rac1 y de los niveles de actina polimerizada inducidos por el IFN- γ . Los macrófagos reparadores de tejido presentan el mayor incremento a nivel de mensajero de CD13 e igualmente presentan un incremento significativo en los niveles de proteína en membrana, sin embargo, aunque se observa que hay fagocitosis a través de CD13 esta es menor después del tratamiento con IL-4.

En cada experimento nosotros encontramos que la fagocitosis por ambos receptores en los macrófagos 0, es menor después de la polarización al fenotipo inflamatorio y reparador de tejido, en el caso de los macrófagos reguladores se observó que estas células incrementan la fagocitosis tanto a través de CD13 como de Fc γ RI (Figura 13). Se ha reportado en este modelo de estudio que los macrófagos inflamatorios incrementan la expresión del receptor Fc γ RI (Rivera 2013). A pesar de esto, nosotros observamos que la fagocitosis específica a través de este receptor disminuye en este fenotipo, también observamos que aunque los macrófagos reparadores de tejido sobreexpresan CD13, el número de células que fagocitan a través de este receptor disminuye significativamente después del tratamiento con IL-4. Los macrófagos reguladores son una población mucho más activa, en este modelo de estudio sobreexpresan no solo CD163 y CD13 como observamos en nuestros resultados, sino también está reportado que sobreexpresan los receptores Fc γ RII (Rivera 2013). Además, en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, el tratamiento con IL-10 incrementa la expresión de todas las clases de receptores Fc γ con excepción del Fc γ RIIIa (Frausto del Rio 2012). En cuanto a fagocitosis, tanto a través de CD13 como de Fc γ RI

incrementan la fagocitosis de eritrocitos de carnero, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura ya que se ha visto que la fagocitosis es de vital importancia en la funcionalidad de estos macrófagos, la fagocitosis de cuerpos apoptóticos y desechos celulares es clave para la resolución de la inflamación y para inducir fenotipos antiinflamatorios (Biswas 2012).

Los antecedentes reportados en distintos modelos de estudio así como los resultados encontrados en este trabajo sugieren que la expresión CD13 es inducida por estímulos proinflamatorios, pero principalmente por estímulos antiinflamatorios; esto sugiere la participación de CD13 en la respuesta inmune realizando diferentes funciones a través de los distintos estadios de un proceso inflamatorio. Así, CD13 sería inducida en macrófagos inflamatorios en estadios tempranos de la inflamación debido a la presencia de citocinas proinflamatorias, contribuyendo con la presentación de antígeno y, posteriormente, en estadios tardíos de inflamación se inducirían los fenotipos de macrófagos reguladores y reparadores de tejido con el fin de controlar la inflamación, en este punto la sobrerregulación de CD13 sería de mayor utilidad contribuyendo a la degradación de péptidos proinflamatorios y posiblemente en procesos de fagocitosis de los macrófagos reguladores, así como en los procesos de adhesión celular, angiogénesis y degradación de componentes de matriz extracelular en los macrófagos reparadores de tejido.

9. CONCLUSIONES

La diferenciación con PMA de células THP-1 da como resultado la obtención de células tipo macrófagos. Además, la polarización de estas células a los fenotipos inflamatorio, regulador y reparador presenta características similares a las reportadas en otros modelos de estudio de macrófagos.

En este trabajo, la expresión de los marcadores CD80 y CD163 puede ser empleada para evaluar la polarización a macrófagos inflamatorios y reguladores respectivamente, pero en el caso de los macrófagos reparadores de tejido es necesario buscar otras alternativas ya que el marcador CD206 no permite discriminar a esta subpoblación.

Los macrófagos inflamatorios presentan un aumento significativo en la expresión del RNA mensajero de CD13, así como una disminución de la capacidad fagocítica a través de este receptor.

Los fenotipos de macrófagos regulador y reparador inducen incrementos en la expresión de CD13 tanto a nivel de membrana como de RNA mensajero, pero el porcentaje de células que fagocitan a través de CD13 solo aumenta en los macrófagos reguladores mientras que disminuye en los reparadores de tejido.

La capacidad fagocítica de CD13 en los macrófagos es distinta entre los diferentes fenotipos de macrófagos polarizados y es independiente de los niveles de expresión del mensajero y la proteína.

10. FIGURAS COMPLEMENTARIAS

FIGURA COMPLEMENTARIA 1. Cambios morfológicos durante el proceso de diferenciación y polarización de las células THP-1. Los monocitos fueron incubados durante 5 días en medio con PMA 20 nM, por los siguientes 3 días con medio libre de PMA y finalmente, 2 días con las correspondientes citocinas: IFN- γ (M. Inf), IL-10 (M. Reg) e IL-4 (M. Rep). Microscopía óptica 40X.

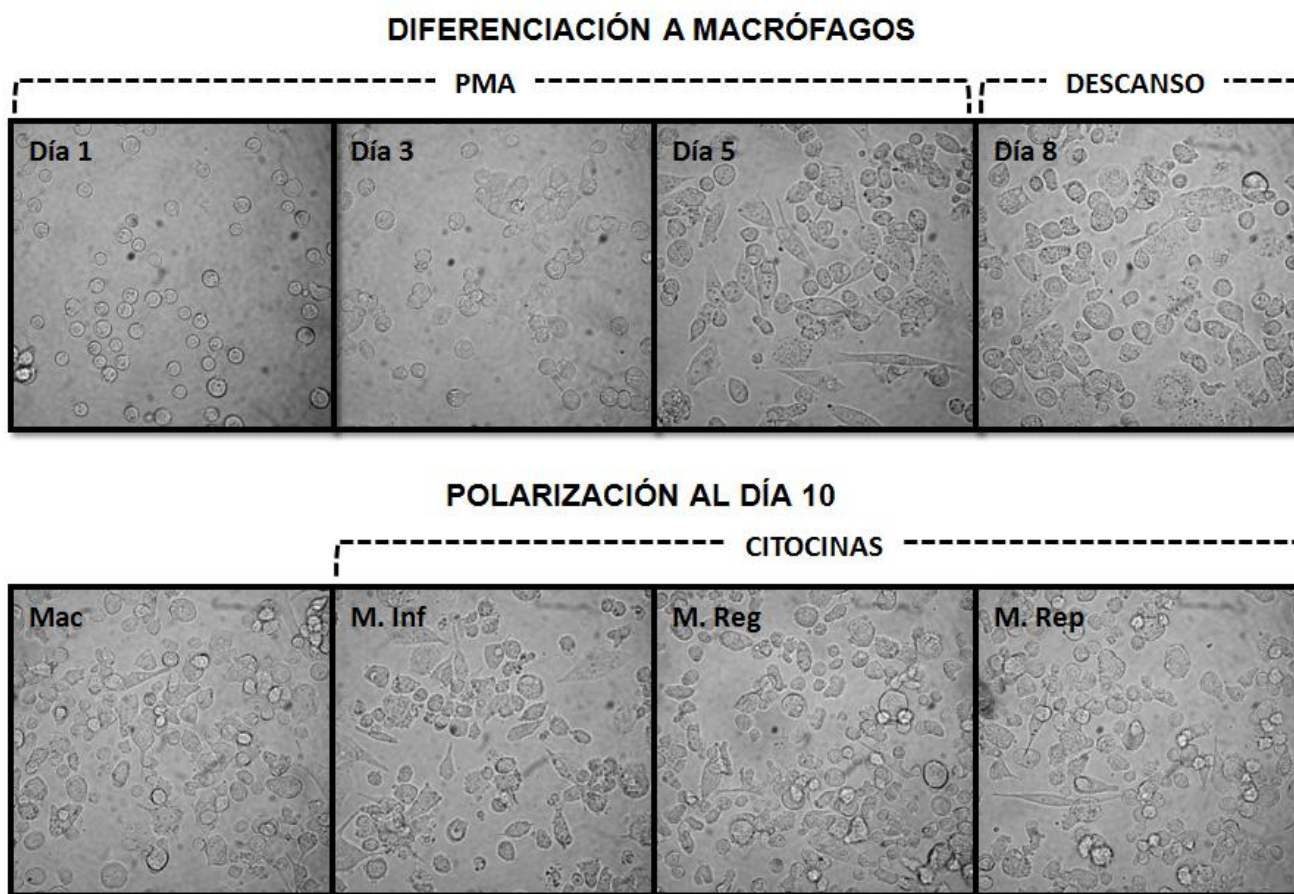


FIGURA COMPLEMENTARIA 2. Expresión de CD11b en los macrófagos polarizados. (A) Histograma representativo de la expresión de CD11b en monocitos (Mo), macrófagos en estadio 0 (Mac), macrófagos inflamatorios (M. Inf), reguladores (M. Reg) y reparadores de tejido (M. Rep). (B) Gráfico de barras que representa el promedio del porcentaje relativo (calculado con la IMF) de la expresión de CD11b con respecto a los monocitos (100%) de 3 experimentos independientes, las

barras de error representan el error estándar de la media (EEM), *p<0.05, **p<0.01 de una prueba t-Student pareada comparando con respecto a los monocitos (Mo).

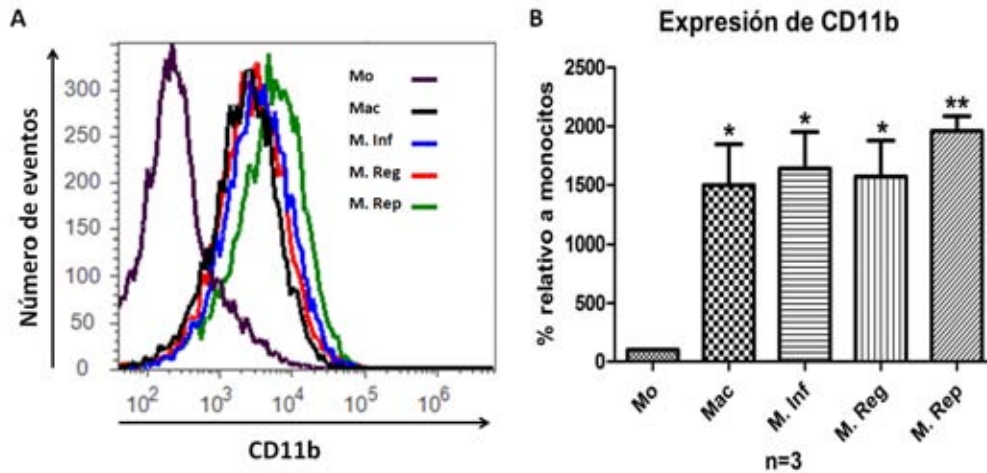


FIGURA COMPLEMENTARIA 3. Expresión de los marcadores de polarización en monocitos comparados con las células tipo macrófagos. Gráfico de barras que representa el promedio de 4 experimentos independientes del porcentaje relativo de expresión de marcadores (CD80, CD163 y CD206) en macrófagos sin polarizar (Mac) con respecto a la expresión en monocitos (100%). Las barras de error representan el error estándar de la media (EEM), *p<0.05, **p<0.01 de una prueba t-Student pareada.

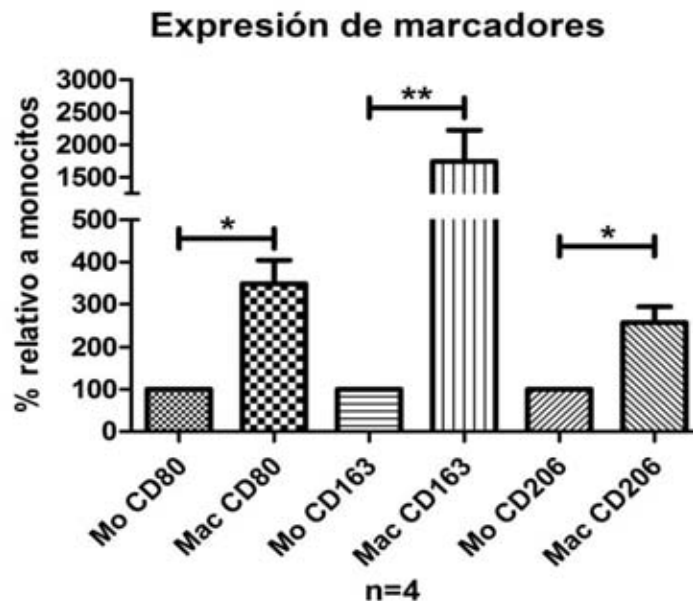


FIGURA COMPLEMENTARIA 4. Eficiencia de la reacción de cada par de oligonucleótidos y validación de rangos dinámicos de CD13. (A) Valor de la pendiente de la recta obtenida de graficar el Ct de CD13 y HPRT contra el logaritmo base 10 de la concentración de una serie de diluciones de cDNA, también se muestra el porcentaje de eficiencia de la reacción. (B) Gráfico de Delta Ct de CD13 (Ct blanco – Ct endógeno) contra logaritmo base 10 de la dilución.

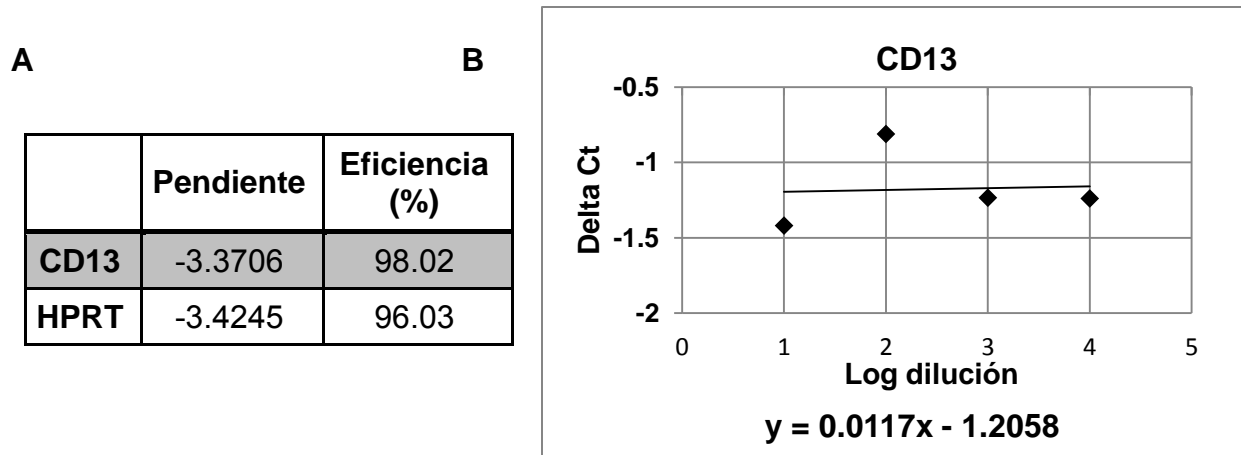


FIGURA COMPLEMENTARIA 5. Curvas de disociación (melting curves) de los productos de amplificación en una reacción representativa de RT-PCR de HPRT y CD13.

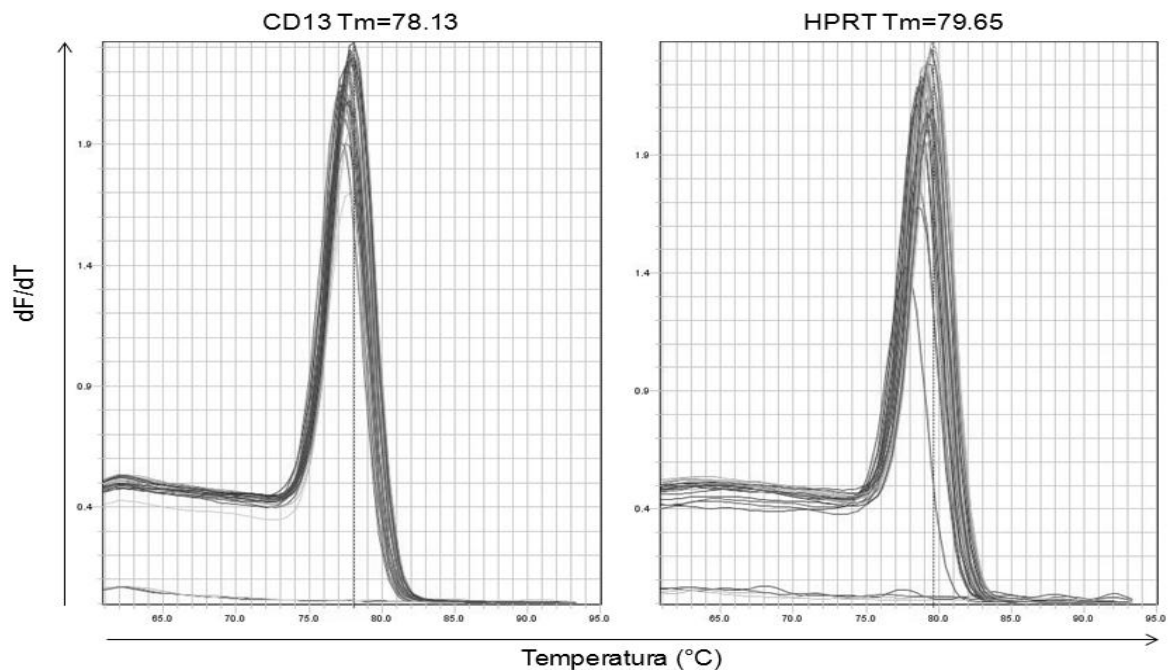


FIGURA COMPLEMENTARIA 6. Fagocitosis a través de CD13 y FcγRI en macrófagos polarizados a 4° C. En la figura se muestran gráficos de puntos de tamaño contra fluorescencia de un ensayo de fagocitosis representativo a 4 °C. Los números en cada gráfico representan el porcentaje de células positivas para la fagocitosis.

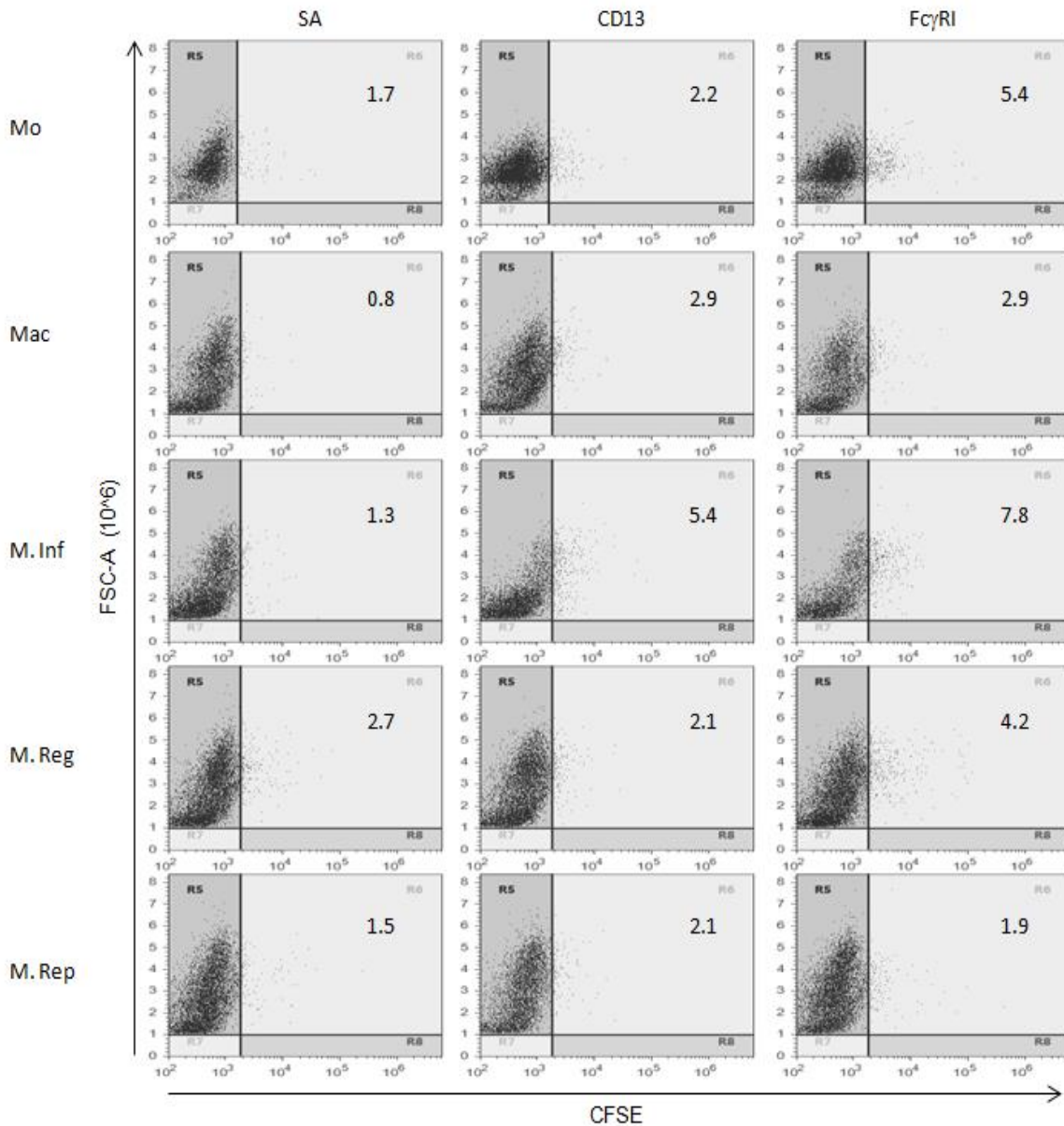
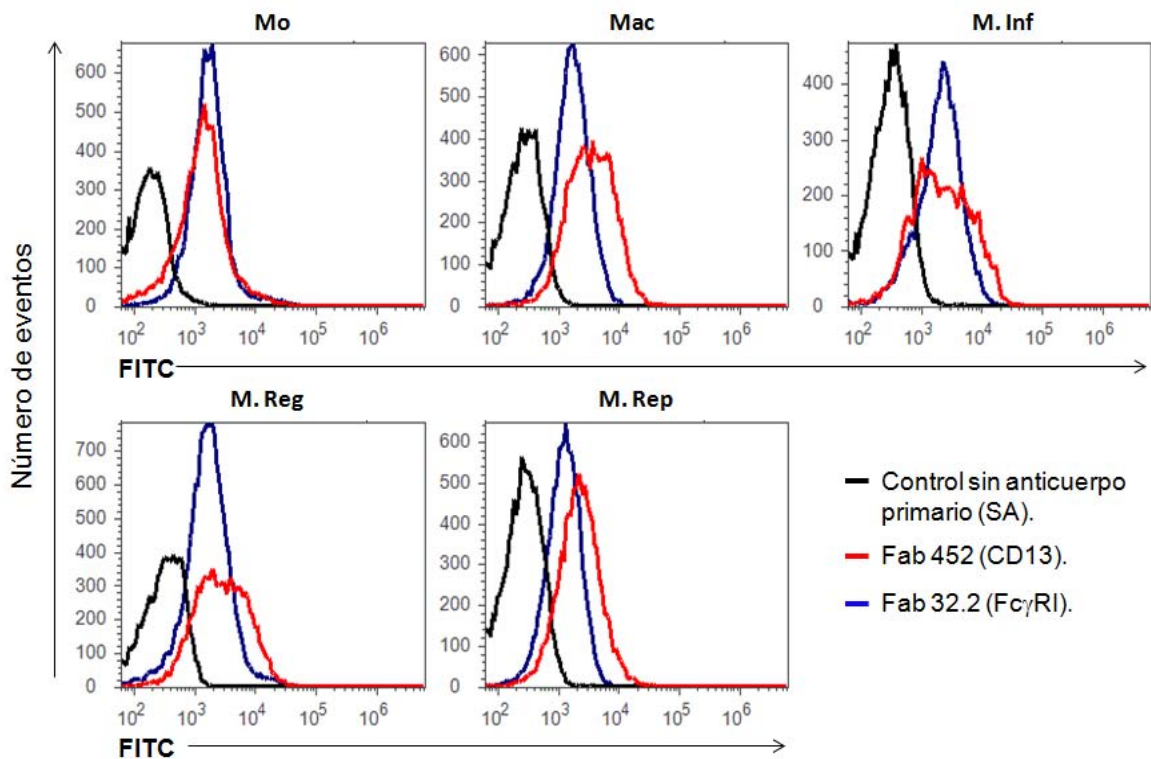


FIGURA COMPLEMENTARIA 7. Unión de fragmentos Fab de anti-CD13 (clona 452) y anti-Fc γ RI (clona 32.2) a monocitos y macrófagos con distintos estados de polarización. Las células utilizadas para los ensayos de fagocitosis fueron incubadas con Fabs de 452 y 32.2, una muestra de estas células se reservó para su incubación con un anticuerpo cabra anti-ratón conjugado con FITC con el fin de determinar la unión de los fragmentos a la superficie de estas células. A continuación se muestran los histogramas representativos de la unión de los Fabs 452 y 32.2 a las diferentes poblaciones celulares estudiadas previo a la fagocitosis.



11. BIBLIOGRAFÍA

1. Bauvois, B. (2004). "Transmembrane proteases in cell growth and invasion; new contributors to angiogenesis?". *Oncogene*. **23**:317-329.
2. Bauvois, B. Dauzonne, D. (2006). "Aminopeptidase N / CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects". *Medicinal Research Reviews*. **26**:88-130.
3. Beutler, B. (2004). "Innate immunity: an overview". *Molecular Immunology* **40**: 845-859.
4. Biswas, S.K. Chittechahath, M. Shalova, I.N. Lim, J. (2012). "Macrophage polarization and plasticity in health and disease". *Immunologic Research*. **53**:11-24.
5. Buechler, C. Ritter, M. Orsó, E. Langmann, T. Klucken, J. Schmitz, G. (2000). "Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and anti-inflammatory stimuli". *Journal of Leukocyte Biology*. **67**:97-103.
6. Cassol, E. Casseta, L. Alfano, M. Poli, G. (2010). "Macrophage polarization and HIV-1 infection". *Journal of leukocyte biology*. **87**: 599-608.
7. Chanput, W. Mes, J.J. Savelkoul, H. Wichers, H.J. (2013). "Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds". *Food and Function*. **4**:266.
8. Daigneault, M. Preston, J.A. Marriott, H.M. Whyte, M.K.B. Dockrell, D.H. (2010). "The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages". *PLOS ONE*. **5(1)**:e8668.
9. Deschamps, C. Echard, A. Niedergang, F. (2013). "Phagocytosis and cytokinesis: Do cells use common tools to cut and to eat? Highlights on common themes and differences". *Traffic*. **14**:355-364.
10. Edwards, J.P. Mosser, D.M. (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation". *Nature Review Immunology* **8**: 959-969.
11. Edwards, J.P. Zhang, X. Frauwirth, K.A. Mosser, D.M. (2006). "Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations". *Journal of Leukocyte Biology*. **80**:1298-1307.

12. Frausto-del-Río, D. Soto-Cruz, I. Garay-Canales, C. Ambriz, X. Soldevila, G. Carretero-Ortega, J. Vázquez-Prado, J. Ortega, E. (2012). "Interferon gamma induces actin polymerization, Rac1 activation and down regulates phagocytosis in human monocytic cells". *Cytokine*. **57(1)**:158-168.
13. Gabrilovac, J. Breljak, D. Cupic, B. (2008). "Regulation of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on the HL-60 cell line by TGF- β 1". *International Immunopharmacology*. **8**:613-623.
14. Gabrilovac, J. Cupic, B. Zivkovic, E. Horvat, L. Majhen, D. (2010). "Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line". *Immunobiology*. **216**:132-144.
15. Goerdts, S. Politz, O. Schledzewski, K. Birk, R. Gratchev, A. Guillot, P. Hakiy, N. Klemke, C. D. Dippel, E. Kodelja, V. Orfanos, C. E. (1999). "Alternative versus classical activation of macrophages". *Pathobiology*. **67**:222-226.
16. Goodridge, H.S. Underhill, D.M. Touret, N. (2012). "Mechanisms of Fc receptors and Dectin-1 activation for phagocytosis". *Traffic*. **13**:1062-1071.
17. Gordon, S. (2002). "Alternative activation of macrophages". *Nature reviews*. **3(1)**:23-35.
18. Graversen, J.H. Madsen, M. Moestrup, S.K. (2002). "CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma". *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **34**:309-314.
19. Gredmark, S. Britt, W.B. Xie, X. Lindbom, L. Soderberg, C. (2004). "Human cytomegalovirus induces inhibition of macrophage differentiation by binding to human aminopeptidase N/CD13". *Journal of Immunology*. **173(8)**:4897-4907.
20. Groves, E. Dart, A.E. Covarelli, V. Caron, E. (2008). "Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells". *Cellular and Molecular Life Sciences*. **65**:1957-1976.
21. 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. García-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.

22. Hoffman, T. Faust, J. Neubert, K. Ansorge, S. (1993). "Dipeptidyl peptidase IV (CD26) and aminopeptidase N (CD13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences". *Federation of European Biochemical Societies*. **336**:61-64.
23. 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.
24. Ji, R.C.(2012). "Macrophages are important mediators of either tumor- or inflammation-induced lymphangiogenesis". *Cellular and Molecular Life Sciences*. **69**:897-914.
25. Jones, C.V. Ricardo, S.D. (2013). "Macrophages and CSF-1". *Landes Bioscience*. **9**:4,249-260.
26. Kang, H. Park, S. Yun, J. Nam, T. Kim, Y. Kim, D. and Kim, Y.J. (2014). "Effect of cinnamon water extract on monocyte-to macrophage differentiation and scavenger receptor activity". *BioMed Central*. **14**:90.
27. Karenhed, K.D. Dahl, S. Nilsson, N.Oberg, F. (2007). "IFN- γ -induced upregulation of Fc γ receptor I during activation of monocytic cell requires the PKR and NF κ B pathways". *Molecular Immunology*. **44**:615-624.
28. Kehlen, A. Geisler, M. Olsen, J. Sablotzki, A. Langner, J. Riemann, D. (2004). "IL-10 and TGF-beta differ in their regulation of aminopeptidase N/CD13 expression in monocytes". *J. Mol. Med.* **13(6)**:877-882.
29. Kehlen, A. Gohring, B. Langner, J. Riemann, D. (1998). "Regulation of the expression of aminopeptidase A, aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 in renal carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by cytokines and cAMP-increasing mediators". *Clinical and Experimental Immunology*. **111**:435-441.
30. Kerrigan, A.M. Brown, G.D. (2008). "C-type lectins and phagocytosis". *ScienceDirect*. **214**:562-575.

31. Kittan, N.A. et al. (2013). "Cytokine induced phenotypic and epigenetic signatures are key to establishing specific macrophage phenotypes". PLOS ONE. 8(10):e78045.
32. Laurant, J. Gijbels, M. van der Velden, S. Manca, M. van der Loos, C.M. Biessen, E. Daemen, M. Lutgens, E. Winther, M. (2012). "Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis". *Atherosclerosis*. **225**:461-468.
33. Licona-Limón, I.I. (2015). "CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells". Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. (submitted paper).
34. Liu, Y.M. 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 Leukocyte Biology*. **77**:767-776.
35. Loke, P. Gallagher, I. Nair, M.G. Zang, X. Brombacher, F. Mohrs, M. Allison, J.P. Allen, J.E. (2007). "Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4 T cells to be sustained during chronic infection". *The Journal of Immunology*. **179(6)**:3926-3936.
36. Lucas, M. Zhang, X. Prasanna, V. Mosser, D.M. (2005). "ERK Activation Following Macrophage Fc γ R Ligation Leads to Chromatin Modifications at the IL-10 Locus". *The Journal of Immunology*. **175**:469-477.
37. MacIntyre, E.A. Roberts, P.J. Jones, M. Van der Schoot, C.E. Favalaro, E.J. Tidman, N. Linch, D.C. (1989). "Activation of human monocytes occurs on cross-linking monocytic antigens to an Fc receptor". *Journal of Immunology*. **142(7)**:2377-2383.
38. MacKenzie, K. Clark, K. Naqvi, S. McGuire, V. Noehren, G. Kristariyanto, Y. van den Bosch, M. Mudaliar, M. McCarthy, P. Pattison, M. Pedrioli, P. Barton, G. Toth, R. Prescott, A. Arthur, J.S. (2013). "PGE₂ induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway". *The Journal of Immunology*. **190**:565-577.
39. Mantovani, A. Sica, A. Sozzani, S. Allavena, P. Vecchi, A. Locati, M. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization". *TRENDS in immunology*. **25(12)**:677-686.

40. Mariani, F. Sena, P. Roncucci, L. (2014). "Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development". *World Journal of Gastroenterology*. **20(29)**:9716-9731.
41. Martinez, F.O. Gordon, S. (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment". *F1000 Prime Reports*. **6**:1-13.
42. Martinez, FO, Sica, A. Mantovani, A. Locati, M. (2008). "Macrophage activation and polarization". *Front Bioscience* **13**:453-61.
43. McWhorter, F.Y. Wang, T. Nguyen, P. Chung, T. Liu, W.F. (2013). "Modulation of macrophage phenotype by cell shape". *Immunology*. **110:43**,17253-17258.
44. Melendez, A.J. Tay, H.K. (2008). "Phagocytosis: a repertoire of receptors and Ca²⁺ as a key second messenger". *Bioscience*. **28**: 287-298.
45. Mestas, J. Hughes, C.C.W. (2014). "Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology". *The Journal of Immunology*. **172**:2731-2738.
46. Miles, S.A. Conrad, S.M. Alves, R.G. Jerónimo, S. Mosser, D. (2005). "A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*". *The Journal of Experimental Medicine*. **201:5**, 747-754.
47. Mina-Osorio, P. (2008). "The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target". *Cell*. **14**:361-371.
48. Mina-Osorio, P. Ortega, E. (2005). "Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes". *Journal of Leukocyte Biology*. **77**:1008-1017.
49. Mosser, D.M. (2003). "The many faces of macrophage activation". *Journal of Leukocyte Biology* **73**: 209–212.
50. Muñoz, P. Ortega, A. Miana, M. Cachofeiro, V. Fernández, A. Gómez, D. (2012). "Ezetimibe inhibits PMA-induced monocyte/macrophage differentiation by altering microRNA expression: A novel anti-atherosclerotic mechanism". *Pharmacological Research*. **66**:536-543.
51. Murray, P.J. et al. (2014). "Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines". *Immunity*. **41(1)**:14-20.

52. Nagareddy, P.R. Kraakman, M. Masters, S.L. Stirzaker, R.A. Gorman, D.J. Grant, R.W. Dragoljevic, D. Hong, E.S. Abdel-Latif, A. Smyth, S.S. Choi, S.H. Korner, J. Bornfeldt, K.E. Fisher, E.A. Dixit, V.D. Tall, A.R. Goldberg, I.J. and Murphy, A.J. (2014). "Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity". *Cell metabolism*. **19**:821-835.
53. Navarrete, A. Langner, J. Herrmann, M. Riemann, D. (2000). "Aminopeptidase N / CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes". *Cellular Immunology*. **201**:22-32.
54. Ohlsson, S.M. Linge, C.P. Gullstrand, B. Lood, C. Johansson, A. Ohlsson, S. Lundqvist, A. Bengtsson, A.A. Carlsson, F. Hellmark, T. (2014). "Serum from patients with systemic vasculitis induces alternatively activated macrophage M2c polarization". *Clinical Immunology*. **152**:10-19.
55. Porcheray, F.V. 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.
56. Reinartz, S. Schumann, T. Finkernagel, F. Wortmann, A. Jansen, J.M. Meissner, W. Krause, M. Schworer, A. Wagner, U. Muller-Brusselbach, S. Muller, R. (2014). "Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: Correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse". *International Journal of Cancer*. **134**:32-42.
57. Riemann, D. Kehlen, A. Langner, J. (1995)." Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N / CD13 and dipeptidylpeptidase IV / CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13". *Clin Exp Immunol*. **100**:277-283.
58. Riemann, D. Tcherkes, A. Hansen, G. Wulfaenger, J. Blosz, T. Danielsen, E.M. (2005). "Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N / CD13 with the Fc γ receptors CD32 and CD64". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **331**:1408-1412.
59. Rivera Fuentes, Ana Diana. (2013). "Determinación de la expresión de los receptores Fc γ en células del sistema monocito/macrófago bajo diferentes estados de activación y las consecuencias en sus funciones efectoras". Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

60. Romieu-Mourez, R. Solis, M. Nardin, A. (2006). "Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages". *Cancer Research*. **66**:10576-10585.
61. Sjostrom, H. (2000). "Structure and function of aminopeptidase N". *Adv Exp Med Biol*. 477:25-34.
62. Soderberg, C. Giugni, T.D. Zaia, J.A. Larsson, S. Wahlberg, J.M. Moller, E. (1993). "CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection". *Journal of Virology*. **67(11)**:6576-6585.
63. Stein, M. Keshav, S. Harris, N. Gordon, S. (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation". *J. Exp. Med*. **176**:287-292.
64. Sternberg, E.M. (2006). "Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens". *Nat Rev Immunol*. **6(4)**:318-328.
65. Stuart, L. Ezekowitz, A. (2005). "Phagocytosis: Elegant complexity". *Immunity*. **22**:539-550.
66. Subramani, J. Ghosh, M. Rahman, M. Caromile, L. Gerber, C. Rezaul, K. Han, D. Shapiro, L. (2013). "Tyrosine phosphorylation of CD13 regulates inflammatory cell-cell adhesion and monocyte trafficking". *The Journal of Immunology*. **191**:3905-3912.
67. Tani, K. Ogushi, F. Huang, L. Kawano, T. Tada, H. Hariguchi, N. Sone, S. (2000). "CD13 / aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis". *Am J Respir Crit Care Med*. **161**:1636-1642.
68. Taylor, P.R. Gordon, S. (2005). "Monocytes and macrophage heterogeneity". *Nature Review Immunology* **5**(953-964).
69. Tokuda, N. Levy, R. (1996). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **211**:244-250.
70. Van den Heuvel, M.M. et al. (1999). "Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation". *Journal of Leukocyte Biology*. **66(5)**:858-866.

71. Van Hal, P. et al. (1992). Regulation of aminopeptidase-N (CD13) and FcεRIIb (CD23) expression by IL-4 depends on the stage of maturation of monocytes/macrophages". The Journal of Immunology. **149**:1395-1401.
72. Van Hal, P. et al. (1994). "Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2)". The American Association of Immunologists. **153**:2718.
73. Villaseñor-Cardoso, M.I. Frausto, D.A. Ortega, E. (2013). "Aminopeptidase N (CD13) is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages". Biomed Research International. 1-12.
74. Wickstrom, M. Larsson, R. Nygren, P. Gullbo, J. (2011). "Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy". The Official Journal of the Japanese Cancer Association". **102**:501-508.
75. Winnall, W.R. Hedger, M.P. (2013). "Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: a new regulatory model". Journal of Reproductive Immunology.**97**:147-158.
76. Wong, A.H.M. Zhou, D. Rini, J.M. (2012). "The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing". The Journal of Biological Chemistry. **287**:36804-36813.
77. Zhang, X. Mosser, D. M. (2008). "Macrophage activation by endogenous danger signals". Wiley InterScience, Journal of Pathology. **214**:161-178.
78. Zhang, X. Xu, W. (2008). "Aminopeptidase N (APN/CD13) as a target for anti-cancer agent design". Current Medicinal Chemistry. **15**:2850-2865.